



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΜΣ «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Εφαρμογή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση
μικροοργανισμών σε γαλακτοκομικά προϊόντα.**

Ζαχαριάδης Λάζαρος



Λάρισα 2017

**«Εφαρμογή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών
σε γαλακτοκομικά προϊόντα.»**

**«The application of molecular markers to identify microorganisms in
dairy products.»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη . Πρωτίστως να τον ευχαριστήσω, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκτέλεση αυτής της εργασίας, αλλά επίσης και για την επιστημονική καθοδήγηση, την υποστήριξη, τις εύστοχες υποδείξεις, και τις διορθώσεις ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία. Να ευχαριστήσω την Επ. Καθ. Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κ. Σαραφίδου Θεολογία, για την συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, για την πολύτιμη βοήθειά του, το ενδιαφέρον, την προθυμία και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ανδρέα Τσιπουρλιάνο για την ουσιαστική συμβολή και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ τους φίλους μου για ηθική και υλική στήριξη που βοήθησε τα μέγιστα για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Λάρισα, 28/09/2017
Ζαχαριάδης Λάζαρος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
Ιστορία του γιαουρτιού	9
Το γιαούρτι ως τρόφιμο.....	9
Παρασκευή – τύποι γιατρού	10
Θρεπτικά συστατικά γιαουρτιού.....	11
Διατροφική αξία γιαουρτιού	12
Είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται.....	13
Παράγοντες που Επηρεάζουν τις Ιδιότητες του Γιαουρτιού	14
Σύνθεση Μικροχλωρίδας Γιαουρτιού	15
Ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί	15
Μικροοργανισμοί και ποιότητα γαλακτοκομικών προϊόντων	16
Παραδοσιακές και σύγχρονες τεχνικές ταυτοποίησης βακτηριακού φορτίου.	18
Χρήση του 16S ριβοσωμικού RNA σε φιλογενετικές αναλύσεις.....	19
Υπερμεταβλητές Περιοχές.....	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
Απομόνωση DNA	21
Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου DNA	22
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	22
PCR και αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA	24
Ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR	24
Δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχηση.....	24
Ανάλυση των αποτελεσμάτων	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
Βακτήρια που ανιχνεύτηκαν	35

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα βρίσκονται ανάμεσα στα πιο καταναλώσιμα αγαθά τόσο στη χώρα μας όσο και παγκοσμίως. Ειδικότερα το γιαούρτι περιλαμβάνεται στη διατροφή των ανθρώπων από τους αρχαίους χρόνους. Από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα (1900) ανακαλύφθηκε ότι τα λιπαρά του γάλακτος που περιέχονται στο γιαούρτι εξουδετερώνουν τα παθογόνα μικρόβια του γαστρεντερικού σωλήνα και η κατανάλωσή του αποτελούσε παράγοντα μακροζωίας ορισμένων λαών . Συνιστά προϊόν ζύμωσης του γάλακτος με τη χρήση θερμόφιλων βακτηρίων του γένους *Streptococcus* και *Lactobacillus*. Επομένως λόγω της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται (το γάλα), της διαδικασίας που ακολουθείται (προσθήκη μικροοργανισμών και ζύμωση) αλλά και κάποιων ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του (υγρή μορφή, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά) αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων. Με την παρούσα διατριβή εφαρμόστηκαν μοριακοί δείκτες για την ανίχνευση και ταυτοποίηση της μικροβιακής κοινότητας σε δείγματα γιαουρτιού. Συγκεκριμένα μετά την απομόνωση του DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου DNA και ακολούθησε PCR και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με Torrent Suite και ION Reporter. Η εφαρμογή της μεθόδου ανίχνευσε τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γιαουρτιού καθώς και βακτήρια που υπάρχουν στο έδαφος και στο νερό. Η ταξινομική ανάλυση έφτασε σε επίπεδο γένους και είδους. Από τις αλληλουχίες που προέκυψαν σε επίπεδο γένους αντιστοιχούν σε οκτώ γένη βακτηρίων και σε επίπεδο είδους σε πέντε είδη βακτηρίων .

Και στα τρία δείγματα γιαουρτιού είχαμε πολύ υψηλά ποσοστά από τα βακτήρια που αποτελούν τη βασική χλωρίδα (*Lactobacillus lactis*) (*Streptococcus thermophilus*) και χρησιμοποιούνται στην διαδικασία παρασκευής γιαουρτιού. Αυτό κρίνεται απολύτως αναμενόμενο και φυσιολογικό. Επίσης σε μικρό ποσοστό ανιχνεύτηκε το βακτήριο *Lactococcus lactis* το οποίο χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην παραγωγή βουτυρογάλακτος και τυριού. Επιπλέον , από την ταξινομική ανάλυση ανιχνεύθηκαν σε μικρά

ποσοστά και ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα από τα γένη *Enhydrobacter*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aerosomonas*, τα οποία διαβιούν στο έδαφος και το νερό και μπορεί να προέρχονται από την υγεία του ζώου (μαστίτιδα κλπ) ή τις συνθήκες διαβίωσης, συλλογής γάλακτος (άρμεγμα) και τρόπους διακίνησης, μέσα συντήρησης και μεταφοράς της πρώτης ύλης και του παραγόμενου προϊόντος.

ABSTRACT

Milk and dairy products are among the most consumable goods in our country as well as in the world. In particular, yoghurt is included in the nutrition of people since the ancient times. Since the beginning of the 1900s it has been discovered that the milk fat contained in yogurt neutralizes the pathogens of the gastrointestinal tract and correlates the consumption of yoghurt with early aging. It is a product of fermentation of milk using obligatory cultures of bacterial primers of the genus *Streptococcus* and *Lactobacillus*. Therefore, because of the raw material used (the milk) of the process followed (addition of microorganisms and fermentation) and its texture (liquid, rich in nutrients) it is an ideal substrate for bacterial growth. This paper developed molecular markers for detecting and identifying the bacterial community in yoghurt samples. In particular, after isolation of the DNA from the samples, qualitative and quantitative determination of the isolated DNA was performed, followed by PCR and sequencing of the 16S rRNA gene. An amplification of the 16S rRNA gene with Multiplex PCR was performed and the results were analyzed with Torrent Suite and ION Reporter. This method was used to amplify sequences and detect the basic bacteria which are commonly used in yogurt production and some other bacteria that exists in soil and water. The classifying analysis identify eight genes and five species of bacteria. In all three samples are detected the common bacterial primers of fermentation of milk (genes *Streptococcus* and *Lactobacillus*) in high percents, which is normal. In low percent are detected other genes of bacteria, which exist in soil and water (genes *Enhydrobacter*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aerosomonas*).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γιαούρτι είναι ένα σημαντικό γαλακτοκομικό προϊόν τόσο της χώρας μας όσο και παγκοσμίως. Είναι εύπεπτη, ελαφριά και θρεπτική τροφή ιδανική για όλες τις ηλικίες. Είναι φυσικό αντιβιοτικό για μακροζωία και βελτιώνει την υγεία όταν καταναλώνεται τακτικά.

Ιστορία του γιαουρτιού

Γενικά το γιαούρτι πιστεύεται ότι πρωτοεμφανίστηκε στη Μέση Ανατολή μεταξύ της σημερινής Τουρκίας και Ιράκ. Περιλαμβάνεται στο διαιτολόγιο των Ελλήνων από τους αρχαίους χρόνους γιατί το θεωρούσαν τροφή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά. Το 1908 ο Ρώσος Νομπελίστας επιστήμονας φυσιολογίας και ιατρικής Dr Elias Metchnikoff ανακάλυψε «ξανά» τις εκπληκτικές αυτές ιδιότητες του γιαουρτιού. Συγκεκριμένα ανακάλυψε ότι τα λιπαρά του γάλακτος εξουδετερώνουν τα παθογόνα μικρόβια του γαστρεντερικού σωλήνα και μελέτησε τη συσχέτισή του με τα πρώιμα γηρατειά στους ανθρώπους. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι το γιαούρτι αποτελούσε παράγοντα για την μακροζωία ορισμένων λαών..

Το γιαούρτι ως τρόφιμο

Στο εμπόριο βρίσκουμε πολλούς τύπους. Όμως όταν λέμε γιαούρτι εννοούμε το παραδοσιακό . Το γιαούρτι φτιάχνεται από γάλα φρέσκο κυρίως αγελαδινό αλλά και πρόβειο στο οποίο έχουν προστεθεί καλλιέργειες που το πηάζουν. Η ζύμωση πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο θερμόφιλων βακτηρίων, του βάκιλλου του γάλακτος (*Lactobacillus delbrueckii*) και του στρεπτόκοκκου (*Streptococcus thermophilus*). Δηλαδή μέσω της δράσης των βακτηρίων αυτών πραγματοποιείται μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ. Η αύξηση του γαλακτικού οξέως μειώνει το PH και μετατρέπει το γάλα σε ένα άλλο προϊόν που έχει παχύρρευστη υφή και χαρακτηριστική υπόξινη γεύση, το γιαούρτι. Η ένδειξη «ζωντανό» σημαίνει ότι εκτός από την παστερίωση του γάλακτος δεν ακολουθήθηκε άλλη διαδικασία (προσθήκη σταθεροποιητών όπως η καραγενάνη , η ζελατίνη , κολλώδεις ουσίες ,

πηκτίνες και άμυλο) στο τελικό προϊόν το οποίο διατηρεί όλα τα γαλακτικά του ένζυμα ζωντανά, και έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή γιαουρτιού στο σπίτι (σαν μαγιά). Η σύσταση του μικροβιακού φορτίου που ανιχνεύεται τόσο στην πρώτη ύλη (αγελαδινό και πρόβειο γάλα) όσο και στο προς κατανάλωση τελικό προϊόν (γιαούρτι) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στα ποιοτικά του χαρακτηριστικά όσο και στην ασφάλεια και τη διατήρηση του προϊόντος. ([http://milkfacts.info/yogurt production](http://milkfacts.info/yogurt%20production))

Παρασκευή – τύποι γιατρού

Το γιαούρτι αποτελεί προϊόν ζύμωσης του γάλακτος, με τη χρήση χαρακτηριστικών βακτηριακών καλλιιεργειών των ειδών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 8,25% ολικά στερεά εκτός των λιπαρών.

Ως πρώτη ύλη του γιαουρτιού χρησιμοποιείται το γάλα όπως αυτό ορίζεται στον Κανονισμό (ΕΚ) 1308/2013 (Παράρτημα VII, Μέρος III, παράγραφος 1).

Δεν επιτρέπεται η χρήση ολικά αφυδατωμένου γάλακτος ή παραγώγων του γάλακτος σε μορφή σκόνης, με εξαίρεση την περίπτωση της παρ. 5, σημ. β.

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά στο πλήρες γιαούρτι πρέπει να είναι τουλάχιστον 3,25% , στο ελαφρύ 2% και μικρότερο από 0,5% στο γιαούρτι χωρίς λιπαρά. Σε περίπτωση χρήσης μιγμάτων γάλακτος η ελάχιστη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίζεται από την αναλογία των ειδών του γάλακτος.

Άλλα συστατικά ,επιτρέπεται να προστεθούν στο γιαούρτι για να ρυθμίσουν την σύσταση του είναι:

α) η προσθήκη κρέμας γάλακτος για τη ρύθμιση της σύστασης σε λιπαρές ουσίες

β) σταθεροποιητές μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την δομή και την σύσταση του γιαουρτιού όπως η καραγενάνη , η ζελατίνη , κολλώδεις ουσίες , πηκτίνες και άμυλο (επιδόρπια γιαουρτιού)

«Στραγγιστό γιαούρτι» χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το γιαούρτι όταν έχει στραγγιστεί- διαχωριστεί από τον ορό του μέσω ειδικού χαρτιού ή φίλτρου , αποκτώντας μια ιδιαίτερη υφή και γεύση.

«Παραδοσιακό» είναι το γιαούρτι που πληρεί τις παρακάτω προδιαγραφές:

α) Παρασκευάζεται με την παραδοσιακή μέθοδο(πήζει μόνο με πητιά) ώστε να φέρει υμένα (πέτσα) στην επιφάνεια του.

β) Παρασκευάζεται από την πήξη αποκλειστικά νωπού ή παστεριωμένου γάλακτος που δεν έχει υποστεί τροποποίηση της φυσικής του σύνθεσης με μόνη εξαίρεση τη ρύθμιση της περιεκτικότητας λιπαρών , με την προσθήκη πρόβειου γάλακτος που είναι πλούσιο σε λιπαρά και συντελεί στην δημιουργία υμένα (πέτσας).

(<http://milkfacts.info/yogurt production>; *Rijkers GT, et al.,2011*)

Θρεπτικά συστατικά γιαουρτιού

Το κυριότερο συστατικό του γιαουρτιού είναι το γάλα. Επειδή είναι συμπυκνωμένο περιέχει περισσότερες πρωτεΐνες και ασβέστιο. Πιο αναλυτικά το γιαούρτι περιέχει:

-Πρωτεΐνες: Περιέχει πρωτεΐνες μεγάλης βιολογικής αξίας(3,22 gr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 5,98 gr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα)

-Μεταλλικά ιχνοστοιχεία: Αποτελεί πλούσια πηγή ασβεστίου(113 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 169 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα) , μαγνησίου (10 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 18 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα), καλίου (143 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 137 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα) και φωσφόρου (91 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 158 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα). Το ασβέστιο είναι περισσότερο γιατί τα υπόλοιπα συστατικά περιέχονται σε συμπυκνωμένα μόρια. Επίσης περιέχει σχετικά μεγάλη ποσότητα σε σίδηρο και μαγνήσιο.

-Βιταμίνες : Περιέχει βιταμίνες όπως βιταμίνη B12 (0,44 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 0,71 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα)

και B2 (0,183 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 0,355 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα). Περιέχει και αρκετή ποσότητα βιταμινών A (28 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα και 44 mgr/100gr γιαουρτιού από πρόβειο γάλα) και E (0.06 mgr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα). Οι βιταμίνες του συμπλέγματος B αυξάνονται με την επίδραση των βακτηριδίων και έτσι σε σχέση με το γάλα διευκολύνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου.

-Γαλακτικό οξύ: Η λακτόζη του αγελαδινού γάλακτος (5,26 gr/100gr γιαουρτιού από πλήρες αγελαδινό γάλα) με το ξίνισμα μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ για αυτό τα άτομα που έχουν δυσανεξία στο γάλα έχουν τη δυνατότητα να τρώνε γιαούρτι. Το γαλακτικό οξύ έχει αντισηπτικές ιδιότητες για το πεπτικό σύστημα, εμποδίζοντας την ανάπτυξη επιβλαβών οργανισμών. Στο πρόβειο γιαούρτι δεν ανιχνεύεται λακτόζη

-Ζωντανοί μικροοργανισμοί: Περιέχει μικροβιακό φορτίο ακόμα και μετά την ζύμωση του γάλακτος). Η επίδραση του οποίου είναι σημαντική γιατί: Βελτιώνει τις γαστρικές εκκρίσεις. Ρυθμίζει την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας. Εμποδίζει την απορρόφηση τοξινών. Παράγει ουσίες και φυσικά αντιβιοτικά ικανά να καταστρέψουν βακτηρίδια που προκαλούν ασθένειες.

([http://milkfacts.info/yogurt production](http://milkfacts.info/yogurt%20production); Rijkers GT, et al.,2011)

Διατροφική αξία γιαουρτιού

Κάθε 100γραμμάρια γιαουρτιού περιέχουν:

- Ενέργεια: 61 θερμίδες
- Υδατάνθρακες: 4,7 γραμμάρια εκ των οποίων σάκχαρα 4,7 γραμμάρια
- Λίπος: 3,3 γραμμάρια εκ των οποίων
 - Κορεσμένα: 2,1 γραμμάρια
 - Μονοακόρεστα : 0,9 γραμμάρια
- Πρωτεΐνες : 3,5 γραμμάρια
- Βιταμίνη A : 2,7mgr (3% της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης)
- Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη 2): 0,14 mgr (9% της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης)
- Ασβέστιο: 121mgr (12% της συνιστώμενης ημερήσιας δόσης)

(VSDA Βάση δεδομένων θρεπτικών συστατικών)

Είδη γάλακτος που χρησιμοποιούνται

Φρέσκο Αγελαδινό γάλα:

Το αγελαδινό γάλα περιέχει 87,7% νερό , 4,9% λακτόζη , 3,4% λιπαρά , 3,3% πρωτεΐνη και 0,7% μέταλλα. Διαχωρίζεται, σύμφωνα με την περιεκτικότητά του σε λίπος, σε τρεις (3) κατηγορίες: 1. «πλήρες», με όλα τα λιπαρά -τουλάχιστον (3,25%) , 2. β) «με χαμηλά λιπαρά» (2%) ή λιγότερο και 3. «χωρίς λιπαρά».

Το φρέσκο αγελαδινό γάλα μικρής διάρκειας μπορεί να κρατήσει μέχρι και πέντε μέρες από την ημερομηνία εμφιάλωσης και παστεριώνεται στους 71,7°C για 15 δευτερόλεπτα τουλάχιστον. Δεν έχει ιδιαίτερα έντονη οσμή.

Μειονεκτήματα: Έχει λιγότερο ασβέστιο σε σχέση με άλλα γάλατα (πρόβειο και κατσικίσιο) ενώ λόγω της περιεκτικότητάς του σε λακτόζη δεν είναι ανεκτό από άτομα που δεν διαθέτουν το ένζυμο λακτάση (υπολακτασία) που διασπά τον εν λόγω δισακχαρίτη. (http://milkfacts.info/yogurt/nutrient_content_of_milk_varieties)

Φρέσκο πρόβειο γάλα:

Υψηλής θρεπτικής αξίας γάλα, με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και ασβέστιο σε σχέση με τα υπόλοιπα γάλατα. Συγκεκριμένα, περιέχει σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα πρωτεϊνών σε σχέση με το αγελαδινό γάλα (14,65gr/244gr γάλακτος και 7,86gr/244gr γάλακτος αντίστοιχα), ενώ περιέχει 25% περισσότερο ασβέστιο (473mg/244gr γάλακτος). Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε λινολεϊκό οξύ (CLA)

Θετικά: Η υψηλή του διατροφική αξία. Η μεγάλη του περιεκτικότητα σε CLA, το οποίο σύμφωνα με πλήθος ερευνών, έχει εκτός των άλλων και αντικαρκινική δράση.

Μειονεκτήματα: Η έντονη οσμή και η επικινδυνότητα ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών κύριως λόγω του αρμέγματος με τα χέρια και της χαμηλής θερμοκρασίας παστερίωσής του. (http://milkfacts.info/yogurt/nutrient_content_of_milk_varieties)

Παράγοντες που Επηρεάζουν τις Ιδιότητες του Γιαουρτιού

1. Σύσταση του Γάλακτος

Η σύσταση του γάλακτος μπορεί να ρυθμιστεί για να επιτευχθεί το επιθυμητό ποσοστό σε λιπαρά και στερεά συστατικά. Οι σταθεροποιητές προστίθενται σε αυτό το στάδιο. Διαφορές στη χημική σύσταση του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γιαουρτιού, έχουν σαν αποτέλεσμα διαφοροποιήσεις στη χημική σύσταση και ποιότητα του παραγόμενου γιαουρτιού.

2. Θερμική Επεξεργασία του Γάλακτος (85°C για 30min ή 95°C για 10 min)

Η υψηλή θερμοκρασία μειώνει τον αριθμό των παθογόνων μικροοργανισμών του γάλακτος και εξασφαλίζει ένα καλύτερο περιβάλλον για να αναπτυχθούν οι καλλιέργειες που το πηζουν, δηλαδή βοηθούν την ανάπτυξη του *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* και του *Streptococcus thermophilus*. και αυξάνεται η συνεκτικότητα και το ιξώδες του γιαουρτιού, βελτιώνοντας την υφή του. .

3. Η Οξύτητα Επηρεάζει την υφή ($\text{pH} \leq 4,5$)

4. Η Ομοιογενοποίηση

Η καλύτερη υφή του γιαουρτιού επιτυγχάνεται με ομοιογενοποίηση του γάλακτος σε πίεση 2000-2500 psi και θερμοκρασία 60-75°C.

5. Η Θερμοκρασία Επώασης

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών για ταχύτερη παραγωγή οξέος είναι οι 42°C. Για χρόνο 2-3 ωρών στους 42°C, επέρχεται η πήξη του γάλακτος και η μετατροπή του σε γιαούρτι. Η θερμοκρασία αυτή αποτελεί την βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που θα πραγματοποιήσουν τη ζύμωση.

6. Ψύξη μετά την επώαση

Το γάλα διατηρείται στη θερμοκρασία των 42°C μέχρι να φτάσει το pH 4,5 - 4,7 ή η οξύτητα 0,9 – 1%. Οι συνθήκες αυτές επιτρέπουν να αναπτυχθεί μια υφή μαλακής γέλης (gel) και η χαρακτηριστική γεύση του γιαουρτιού.

7. Φάσεις ψύξης μετά την επώαση

Στην πρώτη φάση η θερμοκρασία του πηγματος μειώνεται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα για να μειωθεί γρήγορα από 45-42°C. στους 38-35°C. Η φάση

αυτή μπορεί να έχει διάρκεια πολλές ώρες. Στη δεύτερη φάση η θερμοκρασία μειώνεται από τους 38-35°C. στους 20-19°C.. Ο στόχος είναι να παρεμποδιστεί πλήρως η ανάπτυξη των βακτηρίων του γιαουρτιού.

Στην τρίτη φάση της ψύξης μειώνεται από τους 20-19°C. στους 12-10°C. έτσι ώστε να επιβραδυνθεί σε ικανοποιητικό βαθμό η παραγωγή του γαλακτικού οξέος. Η τελευταία φάση της ψύξης χαρακτηρίζεται από τη μείωση της θερμοκρασίας από τους 12-10°C. στους 5°C. .Στην τελευταία αυτή φάση έχουμε μείωση της δράσης των ενζύμων. Φρούτα και γεύσεις προστίθενται σε διαφορετικές φάσεις ανάλογα με τον τύπο του γιαουρτιού

8. Συντήρηση

Στην πράξη οι θερμοκρασίες συντήρησης του γιαουρτιού είναι μεταξύ 2°C. και 5°C.. Για να περιοριστούν οι ενζυματικές αλλαγές στο ελάχιστο πρέπει να χρησιμοποιείται ως θερμοκρασία συντήρησης αυτή των 0°C . Αν οι θερμοκρασίες είναι άνω των 5°C επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών επιμόλυνσης (ζύμες και μύκητες).

(<http://milkfacts.info/yogurt production>; Rijkers GT, et al.,2011)

Σύνθεση Μικροχλωρίδας Γιαουρτιού

Βασική χλωρίδα:

Streptococcus thermophilus και *-Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
(Courtin P. et al., 2003; Lapierre J. et al., 2003)

Συμπληρωματική χλωρίδα:

Ομοζυμωτικά βακτήρια - *Lactobacillus acidophilus* - *Lactobacillus casei* subsp casei - *Lactococcus spp.* - Ετεροζυμωτικά βακτήρια - *Bifidobacterium bifidus* - *Lactobacillus. fermentum* - *Leuconostoc*
(FDA, 2012; Wessels S., et al., 2004; Doughari HJ, et al., 2011)

Ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί

Ζύμες & Μύκητες (Πολλαπλασιάζονται στο χαμηλό pH και στη θερμοκρασία συντήρησης του γιαουρτιού)

Gram (-) βακτήρια και ιδίως κολοβακτηριοειδή (Δεν επιζούν σε στο χαμηλό pH του γιαουρτιού) (Staley J. T., et al. 1987; John G Holt, et al., 1993; Graf J, 2015).

Σταφυλόκοκκοι.

Μικρόκοκκοι.

Σπόροι θερμοάντοχων βακίλων

Μικροοργανισμοί και ποιότητα γαλακτοκομικών προϊόντων

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα του βρίσκονται ανάμεσα στα προϊόντα που επιλέγουν συχνά οι καταναλωτές σε παγκόσμιο επίπεδο. Λόγω της φύσης του, το γάλα αποτελεί ένα ιδανικό υπόστρωμα (υγρή μορφή , πλούσιο σε θρεπτικά) για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας πολυσύνθετης μικροβιακής κοινότητας τόσο στο νωπό όσο και στο παστεριωμένο γάλα. Αυτό το μικροβιακό φορτίο που ανιχνεύεται τόσο στο γάλα προς κατανάλωση, όσο και σε αυτό που θα μεταποιηθεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα ,αποτελεί σημαντικό παράγοντα τόσο για την ποιότητα του προϊόντος, όσον αφορά στην κατανάλωση του, όσο και στον χρόνο διατήρησης μέχρι την κατανάλωση του.

Γίνεται κατανοητό ότι η σύσταση αυτής της μικροβιακής κοινότητας μπορεί να περιέχει μικροοργανισμούς, οι οποίοι ακόμα και μετά την παστερίωση να παίζουν ρόλο στην ποιότητα και την ασφάλεια του προϊόντος, όπως τα *Pseudomonas* και *Acinetobacter* (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007) καθώς και μικροοργανισμούς που ευθύνονται για την εμφάνιση ασθενειών στα ζώα, όπως οι μαστίτιδες (*Streptococcus uberis*), οι οποίες είναι απόρροια των συνθηκών υγιεινής και καλής διαβίωσης τους. Επιπλέον το μικροβιακό φορτίο, περιέχει και μικροοργανισμούς που προσδίδουν στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα ,ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως ιδιαίτερη γεύση, υφή και οσμή. Τα είδη των βακτηρίων που έχουν συνδεθεί με τα επιθυμητά ποιοτικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν είδη όπως τα *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Lactococcus* (Alemayehu et al, 2013, Coppola et al., 2008, Ashraf and Shah, 2011). Τα ανωτέρω είδη, εντοπίζονται

στους ενδογενείς μικροοργανισμούς του γάλακτος αλλά πολλές φορές προστίθενται και εξωγενώς σε κάποιο στάδιο της παραγωγής, βοηθώντας είτε σε στάδια της ζύμωσης είτε στην εμφάνιση των επιθυμητών ποιοτικών χαρακτηριστικών που προαναφέρθηκαν. Τα στελέχη αυτά ανήκουν κυρίως στα γένη των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* και χρησιμοποιούνται από την γαλακτοβιομηχανία για την παραγωγή νέων προϊόντων με την χρήση τους ως πρόσθετα προβιοτικά, τα οποία έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία των καταναλωτών. (Klein et al., 1998; Biavati et al., 2000, Zacarchenco and Massaguer-Roig, 2006). Στόχος επομένως των γαλακτοβιομηχανιών είναι η διατήρηση ενός μικροβιακού φορτίου το οποίο θα εξασφαλίζει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν.

Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή κοινότητα του γάλατος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας αποτελεί ένα ευμετάβλητο σύστημα, το οποίο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες την διάρκεια παραγωγής και μετασυλλεκτικής μεταχείρισης του προϊόντος, είτε αυτό αφορά το γάλα ως πρώτη ύλη, είτε τα παράγωγα του. Η ποικιλία των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν το μικροβιακό φορτίο ξεκινά από το ίδιο το ζώο είτε ως ενδογενές φορτίο, είτε ως φορτίο το οποίο φέρει το ζώο λόγω των συνθηκών υγιεινής και καλής διαβίωσης τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες σταβλισμού, το κατά πόσο το ζώο βρίσκεται σταβλισμένο ή είναι ελευθέρως βοσκής, όσο και από τη χορήγηση αντιβιοτικών παρασκευασμάτων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ασθενειών. Αντίστοιχα σημαντικοί παράγοντες είναι η εποχή που συλλέγεται το γάλα (κυρίως για τα ελευθέρως βοσκής ζώα) και η τοποθεσία των σταβλικών εγκαταστάσεων. (Vacheyrou et al, 2011, Bokulich et al, 2013, Doyle et al, 2016). Επίσης έχειδειχτεί ότι το μικροβιακό φορτίο επηρεάζεται από τις συνθήκες και τον εξοπλισμό κατά την συλλογή (αρμεκτικές μηχανές ή άρμεγμα με τα χέρια), συντήρηση (σε παγολεκάνες) και μεταφορά (με κατάλληλα αυτοκίνητα -ψυγεία) του προϊόντος (Bokulich et al, 2013, Kable et al, 2013).

Παραδοσιακές και σύγχρονες τεχνικές ταυτοποίησης μικροβιακού φορτίου.

Παραδοσιακά, η εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου γίνεται με τεχνικές βασισμένες σε βακτηριακές καλλιέργειες. Αυτές οι τεχνικές μπορεί να υστερούν ως προς την ακρίβεια και την ποιότητα των αποτελεσμάτων τους, καθώς μπορεί να μην ανιχνεύουν: (α) στελέχη με χαμηλή αντιπροσώπευση στο αρχικό δείγμα (*Hugenholtz et al., 1998*) και (β) πολλούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι δύσκολο έως και αδύνατο να καλλιεργηθούν (*Head et al., 1998*). Για να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές όπως SSCP, DGGE, TTGE καθώς και ποσοτικές μέθοδοι όπως αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR) (*Quigley et al., 2011, Graber et al., 2007*). Αν και οι παραπάνω τεχνικές έλυσαν προβλήματα που προέκυπταν από τις μεθοδολογίες βασισμένες σε καλλιέργειες έχουν και αυτές με τη σειρά τους κάποια μειονεκτήματα (π.χ. δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση πολλών μικροοργανισμών, χαρακτηρίζονται από χαμηλή επαναληψιμότητα και ευαισθησία, είναι χρονοβόρες για μεγάλο αριθμό δειγμάτων, περιέχουν μια σχετική υποκειμενικότητα στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων).

Τα παραπάνω προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν με την χρήση τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς. Η ανάπτυξη των μέσων αλληλούχησης τρίτης γενιάς, με την ταυτόχρονη ανάπτυξη των βιοπληροφορικών εργαλείων για την επεξεργασία του μεγάλου όγκου των δεδομένων έδωσαν μια νέα ώθηση στον τομέα της γενετικής και γονιδιωματικής ανάλυσης σε όλους τους τομείς εφαρμογής. Έτσι με τη χρήση παγκόσμιων εκκινήτων που στοχεύουν σχεδόν στο σύνολο των μικροβιακών γονιδιωμάτων και πιο συγκεκριμένα στις υπερμεταβλητές περιοχές του 16S rRNA γονιδίου, και την επακόλουθη αλληλούχηση σε βάθος (deep sequencing) έχουμε την δυνατότητα να αναλύουμε ταυτόχρονα πολλά δείγματα που το καθένα αποτελείται από ένα σύνολο οργανισμών. Η τεχνική αυτή μειώνει σημαντικά το χρόνο και το κόστος διεξαγωγής των αναλύσεων (μεγάλη κλίμακα) σε σύγκριση με της παραδοσιακές τεχνικές, ενώ επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση οργανισμών, οι οποίοι έχουν πολύ

μικρή αντιπροσώπευση στο δείγμα ή που δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση παραδοσιακών τεχνικών μικροβιακής καλλιέργειας. Μελέτες με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς σε γαλακτοκομικά προϊόντα προερχόμενα από διάφορα είδη γαλακτοπαραγωγικών ζώων και σύγκριση των αποτελεσμάτων με παραδοσιακές τεχνικές ανέδειξαν τα πλεονεκτήματα της τεχνικής τόσο για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών οργανισμών όσο και για την παράλληλη ποσοτικοποίηση τους (De Filippis *et al.*, 2014a; Delcenserie *et al.*, 2014; De Pasquale *et al.*, 2014a, 2014b; Dolci *et al.*, 2014; Ercolini *et al.*, 2012; Riquelme *et al.*, 2015; Schornsteiner *et al.*, 2014).

Χρήση του 16S ριβοσωμικού RNA σε φυλογενετικές αναλύσεις

Το 16S ριβοσωμικό RNA (ή 16S rRNA) είναι το συστατικό της μικρής υπομονάδας 30S ενός προκαρυωτικού ριβοσώματος που συνδέεται με την αλληλουχία Shine-Dalgarno. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S ριβοσωμικό RNA αναφέρεται ως γονίδιο 16S rRNA και χρησιμοποιείται σε φυλογενετικές αναλύσεις, λόγω των αργών ρυθμών εξέλιξης αυτής της περιοχής του γονιδίου (Woese C, *et al.*, 1977). Ο Carl Woese και ο George E. Fox ήταν δύο από τους ανθρώπους που πρωτοστάτησαν στη χρήση του 16S rRNA σε φυλογενετική. (Woese C, *et al.*, 1990) Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται για φυλογενετικές μελέτες (Weisburg WG, *et al.*, 1991) καθώς είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων και αρχαίων (Coenye T, *et al.* 2003). Εκτός από τις εξαιρετικά συντηρημένες θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών, οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA περιέχουν υπερμεταβλητές περιοχές, οι οποίες παρέχουν αλληλουχίες ειδικές ανά είδος και είναι χρήσιμες για την ταυτοποίηση βακτηρίων. (Pereira F, *et al.* 2010; Kolbert CP, *et al.*, 1999) Ως αποτέλεσμα, η αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA έχει γίνει διαδεδομένη στην ιατρική μικροβιολογία ως μια γρήγορη και φθηνή εναλλακτική λύση σε σχέση με τις φαινοτυπικές μεθόδους βακτηριακής ταυτοποίησης. (Clarridge JE, 2004)) Αν και αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, βρέθηκε ότι μέσω της αλληλουχίας του 16s είναι εφικτή η εκ νέου κατάταξη βακτηρίων σε νέα είδη (Lu T, *et al.*, 2009) ή ακόμα και γένη (Weisburg WG, *et al.*, 1991). (Brett PJ, *et al.*, 1998) Χρησιμοποιήθηκε

επίσης για να περιγράψει νέα είδη που ποτέ δεν ήταν εφικτό να καλλιεργηθούν. (*Schmidt TM, et al., 1994*) (*Gray JP, et al., 1996*)

Υπερμεταβλητές Περιοχές

Το βακτηριακό γονίδιο 16S περιέχει εννέα υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9) που κυμαίνονται από περίπου 30-100 ζεύγη βάσεων και εμπλέκονται στη δευτερογενή δομή της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (*Gray MW, et al., 1984*). Ο βαθμός συντήρησης ποικίλει ευρέως μεταξύ των υπερμεταβλητών περιοχών, με τις πιο συντηρημένες περιοχές να σχετίζονται με υψηλά επίπεδα ταξινόμησης και οι λιγότερο συντηρημένες περιοχές με χαμηλότερα επίπεδα, όπως γένος και είδη (*Yang B, et al., 2016*). Ενώ οι 16S υπερμεταβλητές περιοχές μπορούν να ποικίλουν δραματικά μεταξύ των βακτηρίων. Το γονίδιο 16S συνολικά διατηρεί μεγαλύτερη ομοιογένεια όσων αφορά το μήκος του σε σχέση με το ευκαρυωτικό του αντίστοιχο, γεγονός που μπορεί να διευκολύνει τη στοίχιση. (*Van de Peer Y, et al., 1996*) Επιπλέον, το γονίδιο 16S περιέχει εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες μεταξύ των υπερμεταβλητών περιοχών, επιτρέποντας τον σχεδιασμό καθολικών εκκινητών που μπορούν να παράγουν αξιόπιστα τα ίδια τμήματα της αλληλουχίας 16S σε διαφορετικά taxa (*Větrovský T, et al., 2013*).

Το γονίδιο 16S rRNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των μικροβίων, επειδή υπάρχει στα περισσότερα μικρόβια και παρουσιάζει τις κατάλληλες αλλαγές. Οι αλληλουχίες του 16S rRNA γονιδίου για τα περισσότερα βακτήρια και τα αρχαία είναι διαθέσιμες σε δημόσιες βάσεις δεδομένων όπως το NCBI. Ωστόσο, η ποιότητα των ακολουθιών που βρίσκονται σε αυτές τις βάσεις δεδομένων συχνά δεν επικυρώνεται. Επομένως, συνήθως χρησιμοποιούνται δευτερεύουσες βάσεις δεδομένων που συλλέγουν μόνο αλληλουχίες του 16S rRNA. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες βάσεις δεδομένων παρατίθενται παρακάτω : EzTaxon-e, Ribosomal Database Project, SILVA, GreenGenes.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα γιαουρτιού που αναλύθηκαν στην μεταπτυχιακή διατριβή αυτή είναι τα εξής:

Ταυτότητα δείγματος	Δείγμα	Ελληνική ονομασία
16S011S1_v1	Yogurt cow	Γιαούρτι αγελαδινό
16S011S2_v1	Yogurt probio 1	Γιαούρτι πρόβειο 1
16S011S4_v1	Yogurt probio 2	Γιαούρτι πρόβειο 2

Πίνακας 1: Συνολικός αριθμός δειγμάτων και ταυτότητα

Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από τα δείγματα γιαουρτιού, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Παίρνουμε 1 ml δείγματος και το τοποθετούμε σε φιαλίδια errendorf των 2ml.
2. Για την απομάκρυνση του λίπους από τα δείγματα προσθέτουμε 1000ml διαλύματος SSC 1X, το αναδεύουμε στο vortex και το φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απομακρύνουμε το λίπος από την επιφάνεια και το υγρό και κρατάμε μόνο το ίζημα.
Παρασκευή διαλύματος 1X SSC: Πρώτα παρασκευάζουμε διάλυμα 20X SSC. Σε φιάλη 1 λίτρου βάζουμε 800ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε 175,3 g NaCl (3M) και 82.2 g κιτρικό νάτριο (300 mM). Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος σε 7 με 1M HCl και συμπληρώνουμε μέχρι το 1 λίτρο με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αραιώνουμε για να προκύψει διάλυμα 1X SSC (150mM NaCl, 15 mM trisodium citrate).
3. Προσθέτουμε 180 µl Genomic Digestion Buffer και 20 µl πρωτεϊνάση K. Αναδεύουμε σε vortex στις 2.500 στροφές μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
4. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55o C για περίπου 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση.

5. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο errendorf των 2 ml.
6. Προσθέτουμε 20 μl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200 μl Genomic Lysis Binding Buffer και αναδεύουμε στο vortex.
8. Προσθέτουμε 200 μl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε στο vortex.
9. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά errendorf με στήλες διαχωρισμού.
10. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 1,5 λεπτό.
11. Αλλάζουμε τις στήλες σε καθαρό errendorf και προσθέτουμε 450 μl Wash Buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 10.
12. Αδειάζουμε τα σωληνάρια errendorf από το υγρό και προσθέτουμε 450 μl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 3,5 λεπτά.
13. Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό errendorf και προσθέτουμε 60 μl Elution Buffer.
14. Τέλος φυγοκεντρούμε, για 1,5 λεπτό στις 14.000 στροφές.
15. Απομακρύνουμε την στήλη και έχουμε έτοιμο το δείγμα του DNA.
16. Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου DNA

Μετά το πέρας της απομόνωσης, το DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά με φωτομέτρηση στα 260nm και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% βάρος κατ'όγκο.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt).

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 0.5 g αгарόζης και 50 ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 1%.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά τη θέρμανση πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.
5. Προστίθενται 1 μl Serva DNA Stain G
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Εισάγεται το ειδικό χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις “πηγάδια” στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι και η χαρτοταινία.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X μέχρι να καλυφτεί το πήκτωμα.
10. Τα δείγματα του DNA αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Αναμειγνύουμε 3 μl loading buffer με 2 μl DNA και στη συνέχεια εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής.
11. Φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια.
12. Κλείνουμε την συσκευή, τη συνδέουμε με το ρεύμα και ρυθμίζουμε την τάση στα 100V. Η ύπαρξη φυσαλίδων είναι ενδεικτικές της ροής του ρεύματος και το DNA μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Μετά από περίπου 30 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή. Το DNA καθίσταται ορατό με την προσθήκη στο δείγμα και στο πήκτωμα βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο ενσωματώνεται και μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει. Το όριο ανίχνευσης είναι περίπου 20 ng DNA. Για την οπτικοποίηση των τμημάτων του DNA στο πήκτωμα, το τελευταίο τοποθετείται σε τράπεζα λάμπας υπεριώδους στο 320 nm ή σε ειδική συσκευή απεικόνισης.

PCR και αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA

Η εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλομορφίας, η ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών και η ανάθεσή τους σε ταξινομικές ομάδες, είναι εφικτή λόγω της μεγάλης συντήρησης του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια και στα αρχαία. Η ταξινομική ανάθεση είναι εφικτή λόγω της παρουσίας 9 υπερμεταβλητών περιοχών (V1-V9), όπου η διαφοροποίηση των αλληλουχιών τους μας επιτρέπει την ταξινόμηση των μικροβίων. Επίσης, λόγω της ύπαρξης συντηρημένων περιοχών που πλαισιώνουν τις μεταβλητές, είναι δυνατή η ενίσχυση μέσω PCR με τη χρήση παγκόσμιων εκκινητών.

Ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR

Η Multiplex PCR πραγματοποιήθηκε με το Ion 16S™ Metagenomics Kit για την ενίσχυση τμημάτων του βακτηριακού 16S rRNA γονιδίου. Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε η ενίσχυση των περιοχών 2,4 και 8 να γίνεται σε μία αντίδραση, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα προϊόντα μεγέθους 250, 288 και 295 βάσεων αντίστοιχα. Σε μία δεύτερη αντίδραση ενισχύονται οι περιοχές 3,6-7 και 9, έχοντας ως αποτέλεσμα προϊόντα μεγέθους 215, 260 και 209 βάσεων αντίστοιχα. Τα σετ των παραπάνω εκκινητών είναι σχεδιασμένα να στοχεύουν >80% των αλληλουχιών της βάσης δεδομένων Greengenes με 100% ομοιότητα για τουλάχιστον ένα ζεύγος εκκινητών.

Δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχηση

Τα PCR προϊόντα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία βιβλιοθήκης με τη χρήση του Ion Plus Fragment Library Kit. Η σήμανση των δειγμάτων γίνεται μέσω του Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 Kit. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με το Ion OneTouch 2 System και το Ion PGM Template OT2 400 Kit. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Ion PGM Sequencing 400 Kit σε μηχανήμα Ion PGM χρησιμοποιώντας το Ion 318 Chip (1).

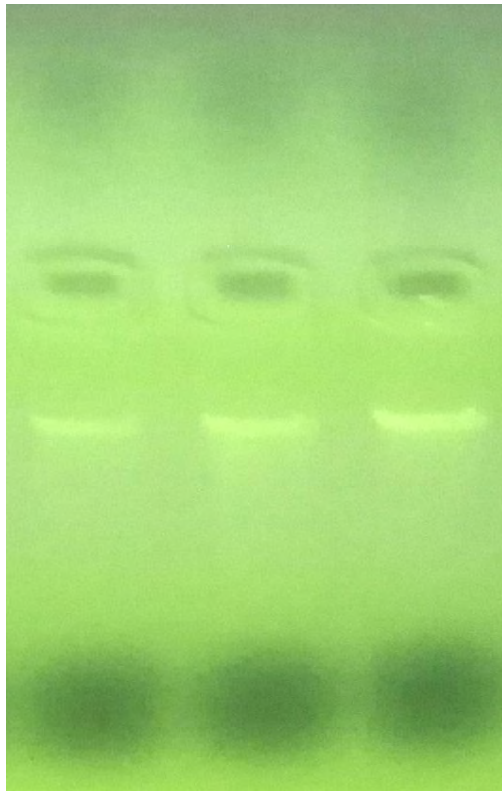
Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του Torrent Suite Software και του Ion Reporter. Ως βάσεις δεδομένων αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 και Curated Greengenes v13.5. Για την ταξινομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα διαβάσματα και από τους δύο εκκινητές ανά ζεύγος και στη συνέχεια οι ακολουθίες των εκκινητών απομακρύνθηκαν. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι αλληλουχίες που είχαν τουλάχιστον 90% αλληλεπικάλυψη μεταξύ της αλληλουχίας επερώτησης και της αλληλουχίας από τη βάση δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες οι οποίες είχαν τουλάχιστον δέκα αναγνώσεις. Το ποσοστό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση γένους είναι 97% ομοιότητα και το ποσοστό για την ταυτοποίηση είδους 99% ομοιότητα. Στις περιπτώσεις όπου η διαφορά ομοιότητας ανάμεσα στις δύο πρώτες αλληλουχίες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την αλληλουχία επερώτησης είναι μικρότερη από 0.2%, χρησιμοποιείται ο όρος “slash ID”.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του Krona (2) και του πακέτου “Phyloseq” της R (3).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αναλύθηκαν τα δείγματα γιαουρτιού για την ανίχνευση και ταυτοποίηση της βακτηριακής κοινότητας. Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος της απομόνωσης DNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% που φαίνεται στην (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1%, του DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα γιαουρτιού

Το σύνολο των αλληλουχιών καθώς και αυτές που πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο και αυτές που χαρτογραφήθηκαν για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Η ταξινομική ανάλυση έφτασε σε επίπεδο γένους και είδους. Σε επίπεδο γένους ανιχνεύθηκαν 8 γένη βακτηρίων (Πίνακας 3) και σε επίπεδο είδους 5 είδη βακτηρίων (Πίνακας 4).

sample ID	sample	Total reads	valid reads	reads ignored	Mapped reads in sample	Un-Mapped reads in sample
16S011S1_v1	Yogurt cow	27256	18016	4395	13621	0
16S011S2_v1	Yogurt probio1	41255	26742	6093	20649	0
16S011S4_v1	Yogurt probio2	26878	17905	4447	13458	0

Πίνακας 2: Συνολικός αριθμός αλληλουχιών που ανιχνεύτηκαν ανά δείγμα, πέρασαν τον ποιοτικό έλεγχο και χαρτογραφήθηκαν.

Στον Πίνακα 2 βλέπουμε τα συνολικά αποτελέσματα της αλληλούχησης (sequencing). Από το σύνολο των αλληλουχιών του δείγματος «yogurt cow» πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο 18016 αλληλουχίες (ποσοστό 66,1%) και χαρτογραφήθηκαν 13621 αλληλουχίες ήτοι ποσοστό 75% επί του συνόλου των αλληλουχιών που πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο και αποτελούν το 50% του συνόλου των αλληλουχιών του δείγματος «yogurt cow».

Από το σύνολο των αλληλουχιών του δείγματος «yogurt probio1» πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο 26742 αλληλουχίες (ποσοστό 64,8%) και χαρτογραφήθηκαν 20649 αλληλουχίες ήτοι ποσοστό 77,2% επί του συνόλου των αλληλουχιών που πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο και αποτελούν το 50% του συνόλου των αλληλουχιών του δείγματος «yogurt probio1 ».

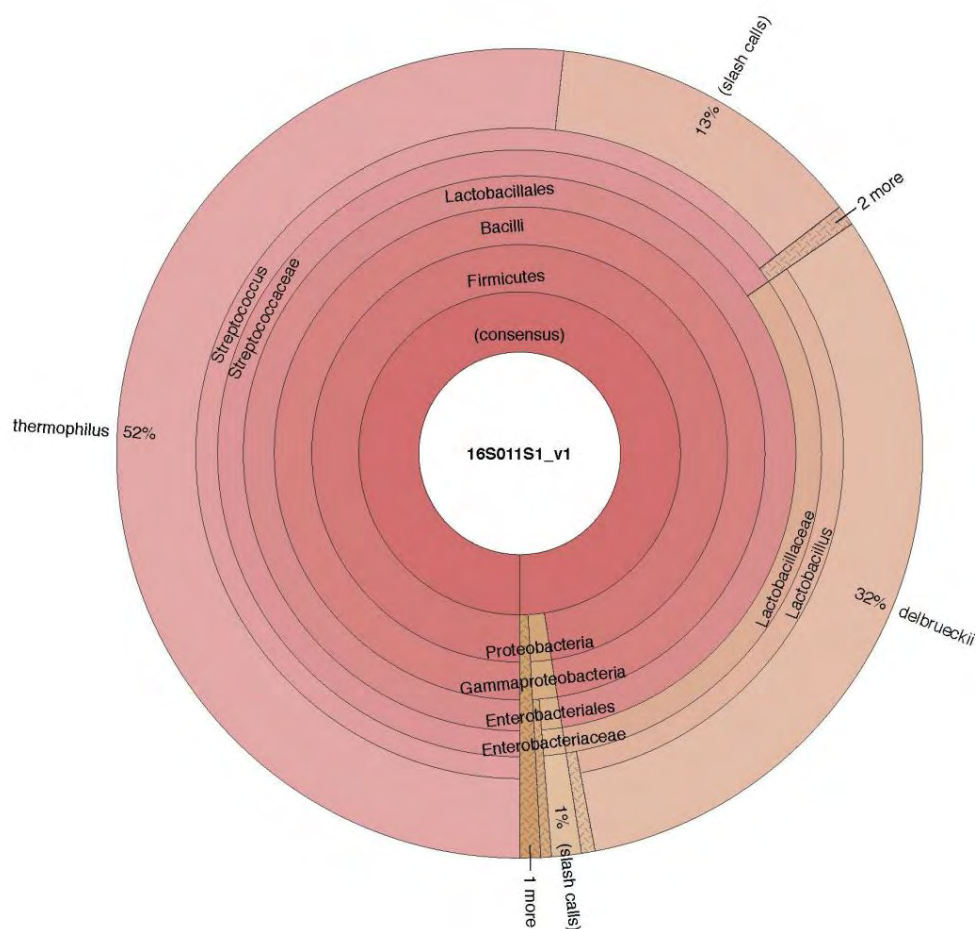
Από το σύνολο των αλληλουχιών του δείγματος «yogurt sheep probio2» πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο 17905 αλληλουχίες (ποσοστό 66,6%) και χαρτογραφήθηκαν 13458 αλληλουχίες ήτοι ποσοστό 75,1% επί του συνόλου των αλληλουχιών που πέρασαν από τον ποιοτικό έλεγχο και αποτελούν το 50% του συνόλου των αλληλουχιών του δείγματος «yogurt sheep probio2».

Στον Πίνακα 3 αναφέρονται αναλυτικά τα γένη των βακτηρίων ανά δείγμα.

Genus	Yogurt cow	Yogurt probio1	Yogurt probio2
<i>Streptococcus</i>	8798	6832	5819
<i>Lactobacillus</i>	4302	13001	5987
<i>Flavobacterium</i>	114	0	1017
<i>Acinetobacter</i>	58	494	442
<i>Aeromonas</i>	0	10	0
<i>Enhydrobacter</i>	0	52	0
<i>Lactococcus</i>	0	22	0

Πίνακας 3: Αριθμός αλληλουχιών που ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο γένους ανά δείγμα.

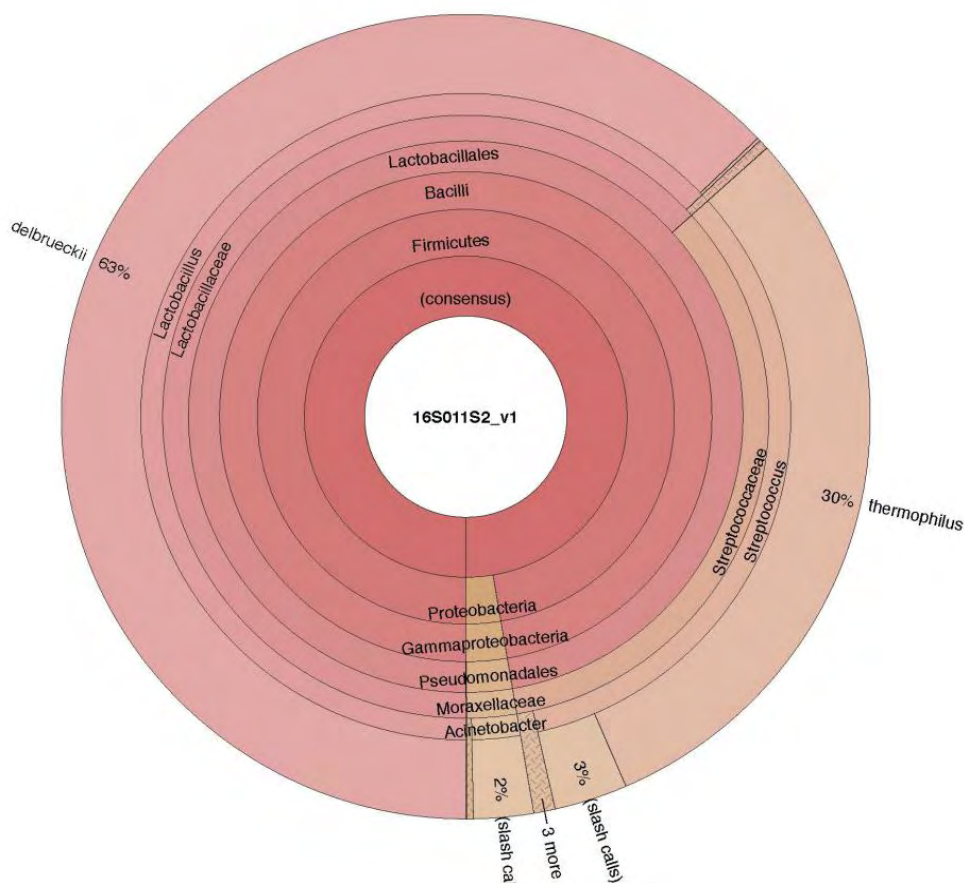
Αναλυτικότερα στο δείγμα «yogurt cow» βρέθηκαν 8798 αλληλουχίες βακτηρίων του γένους *Streptococcus* που αποτελούν το 66,2% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το γένος *Lactobacillus* βρέθηκαν 4302 αλληλουχίες αποτελώντας το 32,4% του συνόλου. Από το γένος *Flavobacterium* βρέθηκαν 114 αλληλουχίες με ποσοστό 0,85% και από το γένος *Acinetobacter* 58 αλληλουχίες ήτοι ποσοστό 0,43% επί του συνόλου.



Εικόνα 2: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής κοινότητας που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα «cow yogurt».

Στο κέντρο των ομόκεντρων κύκλων βλέπουμε την ταυτότητα του δείγματος και όσο προχωράμε προς τους εξωτερικούς κύκλους έχουμε μεγαλύτερη ταξινομική ανάλυση σε επίπεδο φύλου, οικογένειας, γένους και είδους. Στο δείγμα yogurt cow βλέπουμε ότι η ταξινομική ανάλυση έφτασε σε επίπεδο είδους.

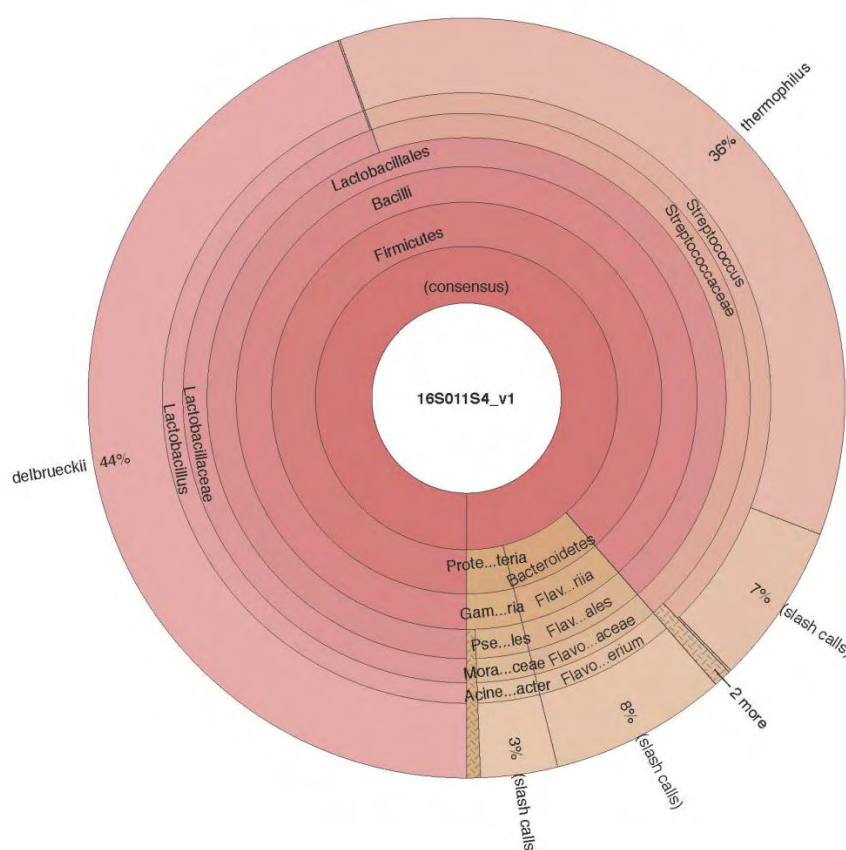
Στο δείγμα «yogurt probio 1» βρέθηκαν 6839 αλληλουχίες βακτηρίων του γένους *Streptococcus* που αποτελούν το 33,4% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το γένος *Lactobacillus* βρέθηκαν 13001 αλληλουχίες αποτελώντας το 63,7% του συνόλου. Από το γένος *Acinetobacter* βρέθηκαν 494 αλληλουχίες με ποσοστό 2,4%, από το γένος *Aeromonas* 10 αλληλουχίες ήτοι ποσοστό 0,05% επί του συνόλου, από το γένος *Enhydrobacter* 92 αλληλουχίες με ποσοστό 0,25% και από το γένος *Lactococcus* 22 αλληλουχίες με ποσοστό 0,1%. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής κοινότητας που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα «yogurt probio1»

Στο κέντρο των ομόκεντρων κύκλων βλέπουμε την ταυτότητα του δείγματος και όσο προχωράμε προς τους εξωτερικούς κύκλους έχουμε μεγαλύτερη ταξινομική ανάλυση σε επίπεδο φύλου, οικογένειας, γένους και είδους. Στο δείγμα yogurt probio 1 βλέπουμε ότι η ταξινομική ανάλυση έφτασε σε επίπεδο είδους.

Αντίστοιχα στο δείγμα «yogurt probio 2» βρέθηκαν 5819 αλληλουχίες βακτηρίων του γένους *Streptococcus* που αποτελούν το 43,8% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το γένος *Lactobacillus* βρέθηκαν 5987 αλληλουχίες αποτελώντας το 45,1% του συνόλου. Από το γένος *Flavobacterium* βρέθηκαν 1017 αλληλουχίες με ποσοστό 7,6% και από το γένος *Acinetobacter* 442 αλληλουχίες με ποσοστό 3,3% επί του συνόλου. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής κοινότητας που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα «yogurt probio2»

Στο κέντρο των ομόκεντρων κύκλων βλέπουμε την ταυτότητα του δείγματος και όσο προχωράμε προς τους εξωτερικούς κύκλους έχουμε μεγαλύτερη ταξινομική ανάλυση σε επίπεδο φύλου, οικογένειας, γένους και είδους. Στο δείγμα yogurt probio 2, βλέπουμε ότι η ταξινομική ανάλυση έφτασε σε επίπεδο είδους.

Στον Πίνακα 4 βλέπουμε αναφέρονται αναλυτικά τα είδη των βακτηρίων ανά δείγμα.

Row.names	Yogurt cow	Yogurt probio1	Yogurt probio2
<i>Lactobacillus_delbrueckii</i>	4302	12974	5987
<i>Streptococcus_thermophilus</i>	7049	6227	4881
<i>Streptococcus_uberis</i>	0	0	14
<i>Enhydrobacter_aerosaccus</i>	0	52	0
<i>Lactococcus_lactis</i>	0	22	0

Πίνακας 4: Αριθμός αλληλουχιών που ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο είδους ανά δείγμα

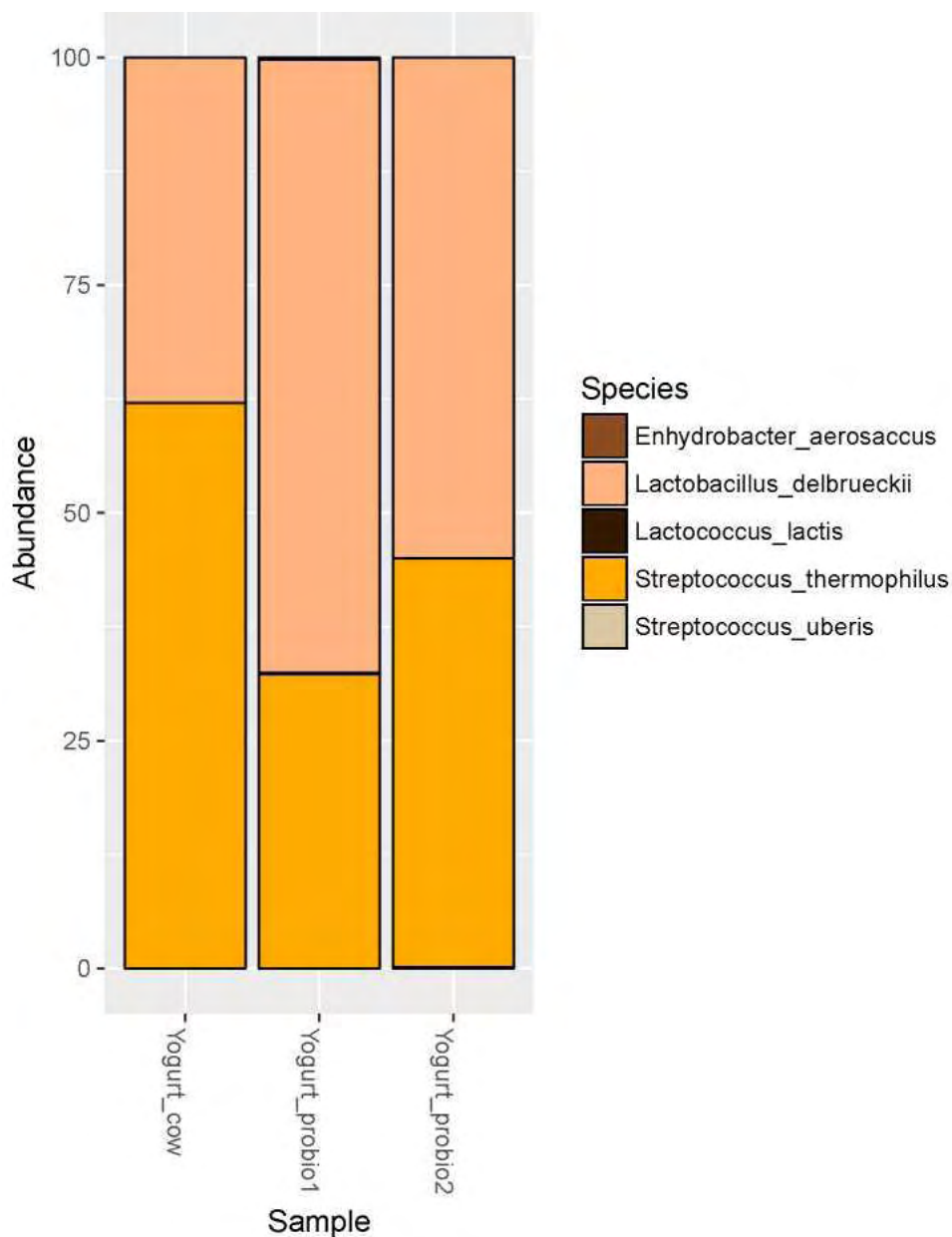
Αναλυτικότερα στο δείγμα «yogurt cow » βρέθηκαν 4302 αλληλουχίες βακτηρίων του είδους *Lactobacillus delbrueckii* που αποτελούν το 32,4% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το είδος *Streptococcus thermophilus* βρέθηκαν 7049 αλληλουχίες αποτελώντας το 53,1% επί του συνόλου.

Στο δείγμα «yogurt probio 1» βρέθηκαν 12974 αλληλουχίες βακτηρίων του είδους *Lactobacillus delbrueckii* που αποτελούν το 63,5% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το είδος *Streptococcus thermophilus* βρέθηκαν 6227 αλληλουχίες αποτελώντας το 30,5% του συνόλου. Από το είδος *Enhydrobacter aerosaccus* βρέθηκαν 52 αλληλουχίες με ποσοστό 0,25% και από το είδος *Lactococcus lactis* βρέθηκαν 22 αλληλουχίες με ποσοστό 0,1% επί του συνόλου.

Στο δείγμα «yogurt probio 2» βρέθηκαν 5987 αλληλουχίες βακτηρίων του είδους *Lactobacillus delbrueckii* που αποτελούν το 45,1% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το είδος *Streptococcus thermophilus* βρέθηκαν 4881 αλληλουχίες αποτελώντας το 36,7% του συνόλου. Από το είδος

Streptococcus uberis βρέθηκαν 14 αλληλουχίες με ποσοστό 0,1% επί του συνόλου.

Για την αρτιότερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αλληλούχιση των δειγμάτων κρίθηκε σκόπιμο να προστεθεί και η συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών των βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν στα τρία δείγματα σε επίπεδο είδους. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών των βακτηρίων που ανιχνευθήκαν στα τρία δείγματα γιαουρτιού σε επίπεδο είδους.

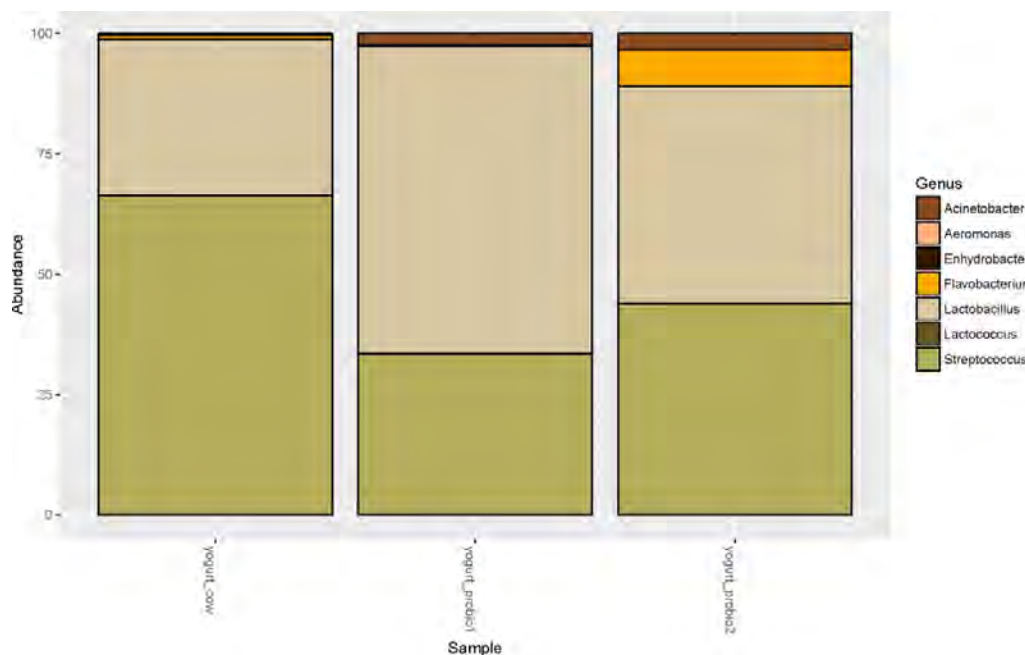
Με διαφορετικό χρώμα βλέπουμε τα ποσοστά % των βακτηρίων σε επίπεδο είδους ,που ανιχνεύτηκαν για κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Και στα τρία δείγματα , η μέθοδος που εφαρμόστηκε, ανίχνευσε τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του γιαουρτιού. Συγκεκριμένα στο δείγμα «yogurt cow» βρέθηκαν τα είδη *Lactobacillus delbrulckii* σε ποσοστό 32,4% και το είδος *Streptococcus thermophilus* σε ποσοστό 53,2%.

Στο δείγμα «yogurt probio 1» βρέθηκαν τα είδη *Lactobacillus delbrulckii* σε ποσοστό 63,5%. Το είδος *Streptococcus Thermophilus* σε ποσοστό 30,5%.

Στο δείγμα «yogurt probio 2»βρέθηκαν τα είδη: *Lactobacillus delbrulckii* σε ποσοστό 45,1%. Το είδος *Streptococcus Thermophilus* σε ποσοστό 36,7%.

Επιπλέον ανιχνεύτηκαν ίχνη βακτηρίων (στα δύο από τα τρία δείγματα) τα οποία διαβιούν στο έδαφος και στο νερό και δεν αποτελούν την βασική βακτηριακή χλωρίδα του γιαουρτιού. Στο δείγμα «yogurt cow» δεν ανιχνεύτικαν άλλα είδη .Στο δείγμα «yogurt probio 1» το είδος *Enyhydrobacter* σε ποσοστό 0,25% και το είδος *Lactococcus* σε ποσοστό 0,1%. Στο δείγμα «yogurt probio 2» το είδος *Streptococcus Uberis* σε ποσοστό 0,1%.



Εικόνα 6. Συγκριτική απεικόνιση των ποσοστών των βακτηρίων που ανιχνευθήκαν στα τρία δείγματα γιαουρτιού σε επίπεδο γένους

Με διαφορετικό χρώμα βλέπουμε τα ποσοστά % των βακτηρίων σε επίπεδο γένους ,που ανιχνεύτηκαν για κάθε ένα δείγμα ξεχωριστά.

Σε επίπεδο γένους (Εικόνα 6) και στα τρία δείγματα, η μέθοδος που εφαρμόστηκε, ανίχνευσε τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του γιαουρτιού Συγκεκριμένα στο δείγμα «yogurt cow» αλληλουχίες του γένους *Streptococcus* σε ποσοστό 66,9 % επί του συνόλου) και αλληλουχίες του γένους *Lactobacillus* σε ποσοστό 32,4% επί του συνόλου) Στο δείγμα «yogurt probio 1» βρέθηκαν τα παρακάτω γένη : Το γένος *Lactobacillus* σε ποσοστό 63,7% επί του συνόλου , το γένος *Streptococcus* σε ποσοστό 33,4% επί του συνόλου.

Στο δείγμα «yogurt probio 2»βρέθηκαν τα παρακάτω βακτήρια: το γένος *Streptococcus* σε ποσοστό 43,8% επί του συνόλου, το γένος *Lactobacillus* σε ποσοστό 45,1% επί του συνόλου .

Επιπλέον ανιχνεύτηκαν ίχνη βακτηρίων (στα δύο από τα τρία δείγματα) τα οποία διαβιούν στο έδαφος και στο νερό και δεν αποτελούν την βασική βακτηριακή χλωρίδα του γιαουρτιού. Στο δείγμα «yogurt cow» δεν ανιχνεύθηκαν άλλα γένη. Στο δείγμα «yogurt probio 1» βρέθηκαν το γένος *Acinetobacter* σε ποσοστό 2,4% , το γένος *Aeromonas* σε ποσοστό 0,05% το γένος *Enhydrobacter* σε ποσοστό 0,25% και το γένος *Lactococcus* σε ποσοστό 0,1%. Στο δείγμα «yogurt probio 2»βρέθηκαν το γένος *Flavobacterium* σε ποσοστό 7,6 %και το γένος *Acinetobacter* σε ποσοστό 3,3 %.

Βακτήρια που ανιχνεύτηκαν

1. *Streptococcus thermophilus*

Το *Streptococcus thermophilus* , επίσης γνωστός ως *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (Tannock, et al. 2005; International Journal of Systematic Bacteriology, 1995) είναι ένα θετικό κατά gram –βακτήριο και είναι προεραϊκά αναερόβιο από την ομάδα των viridians (European Bioinformatics Institute, 2013). Δίνει αρνητική την αντίδραση καταλάσης και οξειδάσης ενώ είναι θετικό για άλφα αιμολυτική δραστηριότητα (European Bioinformatics Institute, 2013). Είναι μη κινητικό και δε σχηματίζει ενδοσπόρια (European

Bioinformatics Institute, 2013). Το *Streptococcus thermophilus* είναι ραβδόμορφο βακτήριο. Έχει ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 35-42°C ενώ το *Lactobacillus bulgaricus* μεταξύ 43-46°C (Influence_of_temperature_on_associative_growth_of_Streptococcus_thermophilus_and_Lactobacillus_bulgaricus). Κατατάσσεται επίσης και ως βακτήριο γαλακτικού οξέως (Courtin P. et al., 2003). Το *Streptococcus thermophilus* βρίσκεται στα ζυμωθέντα γαλακτομικά προϊόντα και γενικά χρησιμοποιείται στην παραγωγή του γιαουρτιού (Kiliç AO et al., 1996) μαζί με το *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Τα δύο είδη λειτουργούν συνεργατικά και το *Streptococcus thermophilus* πιθανόν να παρέχει στο *Lactobacillus bulgaricus* φολικό οξύ και φορμικό οξύ, τα οποία χρησιμοποιεί για τη σύνθεση πουρινών. (Sieuwerts S, et al., 2010). Το γένος *Streptococcus* περιλαμβάνει αρκετά παθογόνα είδη, όπως το *Streptococcus pneumoniae* και το *Streptococcus pyogenes*, αλλά οι εταιρείες τροφίμων θεωρούν ότι το *Streptococcus thermophilus* είναι μη-παθογόνο. Το *Streptococcus thermophilus* θεωρείται ότι έχει εξελιχθεί ξεχωριστά από τα παθογόνα είδη των στρεπτόκοκκων τα τελευταία 3000 χρόνια. Οι ερευνητικές ομάδες ανέλυσαν το γονιδίωμα δύο στελεχών του *Streptococcus thermophilus*, τα CNRZ1066 και LMG13811 και δήλωσαν ότι τα βακτήρια δεν είναι επικίνδυνα. (International Research Associates, 2011). Ήδη από το 1900, το *Streptococcus thermophilus* έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή γιαουρτιού. Σκοπός του είναι να μετατρέψει τη λακτόζη, σε γαλακτικό οξύ. Η αύξηση του γαλακτικού οξέος μετατρέπει το γάλα σε μια δομή τύπου γέλης, που χαρακτηρίζει το γιαούρτι. (Delcour J. et al., 2000)

2. *Lactobacillus delbrueckii*

Το *Lactobacillus delbrueckii* είναι ένα βακτήριο θετικό κατά gram, μη κινητικό. Χαρακτηριστικό του είδους είναι η ικανότητά του να ζυμώνει υποστρώματα σακχάρων σε προϊόντα γαλακτικού οξέος υπό αναερόβιες συνθήκες. Ως εκ τούτου, τα *Lactobacillus delbrueckii* απαντώνται γενικά σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως γιαούρτι, γάλα και τυρί, με την εξαίρεση του *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* που βρίσκεται σε φυτικές πηγές (Lapierre J. et al., 2003). Υπάρχουν τέσσερα υποείδη που διαφοροποιούνται από τους μεταβολίτες τους και την γενετική τους δομή. Το *Lactobacillus*

delbrueckii είναι μη παθογόνο. Στην πραγματικότητα, χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και μπορεί να βρεθεί σε γιαούρτι, γάλα, λαχανικά και τυριά. Οι διατροφικές απαιτήσεις του βακτηρίου προσαρμόζονται στο περιβάλλον του και περιλαμβάνουν χωρίς να περιορίζονται μόνο σε αυτά, αμινοξέα, βιταμίνες, υδατάνθρακες και ακόρεστα λιπαρά οξέα (Partanen L. et al., 2001). Το *Lactobacillus delbrueckii* έχει μια βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 40-44 ° C υπό αναερόβιες συνθήκες (Lapierre J. et al., 2003). Συγκεκριμένα, ο *Lactobacillus subsp. bulgaricus* έχει μία συμβιωτική σχέση με το *Streptococcus thermophilus* καθώς συνυπάρχει στις καλλιέργειες βακτηρίων εκκίνησης γαλακτικού οξέος.

3. *Lactococcus lactis*

Το *Lactococcus lactis* είναι ένα θετικό κατά gram βακτήριο που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην παραγωγή βουτυρογάλακτος και τυριού (Madigan M, et al., 2005). Τα κύτταρα *Lactococcus lactis* είναι κόκκοι οι οποίοι εντοπίζονται σε ζεύγη και βραχείες αλυσίδες και, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης, εμφανίζονται ως ωοειδή με τυπικό μήκος 0,5-1,5 μm. Το *Lactococcus lactis* δεν παράγει σπόρια και δεν είναι κινητικό παράγει γαλακτικό οξύ από σάκχαρα. έχει επίσης αναφερθεί ότι παράγει αποκλειστικά L - (+) - γαλακτικό οξύ (Roissart H. and Luquet F.M, 1994). Ωστόσο, (Åkerberg C. Et al., 1998) έχει αναφερθεί ότι το D - (-) - γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί όταν καλλιεργηθεί σε χαμηλό pH. Η ικανότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους το *Lactococcus lactis* είναι ένας από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς στη γαλακτοκομική βιομηχανία. Με βάση το ιστορικό του στη ζύμωση των τροφίμων, το *Lactococcus lactis* έχει αναγνωριστεί γενικά ως ασφαλής (GRAS) (FDA, 2012; Wessels S., et al., 2004), με λίγες αναφορές περιστατικών ότι είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο (Aguirre M., et al. 1993; Facklam RR, et al., 1990; Mannion PT, et al., 1990). Το *Lactococcus lactis* έχει ζωτική σημασία για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το βουτυρόγαλα και τα τυριά. Όταν ο *Lactococcus lactis ssp. To lactis* προστίθεται στο γάλα, το βακτήριο χρησιμοποιεί ένζυμα για την παραγωγή ενεργειακών μορίων (ATP), από τη λακτόζη. Το παραπροϊόν της παραγωγής ενέργειας ATP είναι το γαλακτικό οξύ. Άλλες χρήσεις που έχουν αναφερθεί για

αυτό το βακτήριο περιλαμβάνουν την παραγωγή τουρσί λαχανικών, μπύρας ή κρασιού, μερικά ψωμιά και άλλα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως το κεφίρ από το γάλα σόγιας, το βουτυρόγαλα και άλλα. Το *Lactococcus lactis* είναι ένα από τα καλύτερα χαρακτηριζόμενα θετικά κατά Gram βακτήρια και υπάρχουν λεπτομερείς γνώσεις για τη γενετική, τον μεταβολισμό και τη βιοποικιλότητα του (Kok J., et al., 2005; Van Hylckama Vlieg, et al., 2006)

4. *Streptococcus uberis*

Θετικό κατά gram μη κινητικό. Το *Streptococcus uberis* βρίσκεται σε πολλές περιοχές του σώματος και έχει απομονωθεί από το δέρμα, το έντερο, τις αμυγδαλές και το γεννητικό σύστημα βοοειδών. Μπορεί να μολύνει τον μαστικό αδένα των βοοειδών όπου προκαλεί μαστίτιδα, μια φλεγμονώδη νόσο. Η μόλυνση με *Streptococcus uberis* είναι μία από τις κυριότερες αιτίες της μαστίτιδας των βοοειδών παγκοσμίως και η πιο κοινή αιτία στο Ηνωμένο Βασίλειο. Το *Streptococcus uberis* ανιχνεύεται συχνά στα κόπρανα και μπορεί επίσης να απομονωθεί από το περιβάλλον (βοσκότοποι, υλικά στρωμνής) που κατοικούν βοοειδή. Ωστόσο, επιβιώνει στο περιβάλλον για λιγότερο από 4 εβδομάδες

5. *Enhydrobacter aerosaccus*

Το *Enhydrobacter aerosaccus* είναι αρνητικό κατά gram, μη κινητικό βακτήριο θετικό για τις δοκιμές της καταλάσης και της οξειδάσης, το οποίο περιέχει κενोटόπια αερίου (Staley J. T., et al. 1987; John G Holt, et al., 1993).

Θεωρείτε βακτήριο περιβαλλοντικής προέλευσης και έχει ανιχνευθεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα σε χαμηλά επίπεδα. (Pyrosequencing Analysis of the Microbial Diversity of Airag, Khoormog and Tarag, Traditional Fermented Dairy Products of Mongolia)

6. *Flavobacterium*

Το *Flavobacterium* είναι ένα γένος αρνητικών κατά gram βακτηρίων σε σχήμα ράβδου, το οποίο περιλαμβάνει 130 αναγνωρισμένα είδη (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001) καθώς και τρία πρόσφατα

προτεινόμενα είδη (*Flavobacterium gondwanense*, (Dobson, et al, 1993) *Flavobacterium salegens*, (Dobson; et al, 1993) και του *Flavobacterium scophthalmum* (Mudarris et al., 1993)). Τα φλαβοβακτήρια βρίσκονται στο έδαφος και στο φρέσκο νερό σε ποικίλα περιβάλλοντα. Αρκετά είδη είναι γνωστό ότι προκαλούν ασθένειες σε ψάρια γλυκού νερού (Bernardet, et al, 1994). Μέλη αυτού του γένους συχνά ανιχνεύονται στο χώμα και το νερό, επίσης έχουν απομονωθεί από τρόφιμα όπως ωμό κρέας και γάλα.

7. *Acinetobacter*

Το *Acinetobacter* είναι ένα γένος αρνητικών κατά gram βακτηρίων που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των *Gammaproteobacteria*. Τα είδη *Acinetobacter* είναι αρνητικά στην δοκιμή οξειδάσης, παρουσιάζουν κινητικότητα, (Bitrian M. et al., 2013) και εμφανίζονται σε ζεύγη. Τα είδη *Acinetobacter* είναι ευρέως κατανομημένα στη φύση και εμφανίζονται συνήθως στο έδαφος και στο νερό (Doughari HJ, et al., 2011). Η ικανότητά τους να επιβιώνουν σε υγρό και στεγνές επιφάνειες, καθώς και η ικανότητα επιβίωσής τους όταν εκτίθενται σε διάφορα κοινά απολυμαντικά, επιτρέπει κάποια είδη *Acinetobacter* να επιβιώνουν σε νοσοκομειακό περιβάλλον. (Doughari HJ, et al., 2011) Επιπλέον, τα είδη *Acinetobacter* μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, επιτρέποντάς τους να επιβιώσουν σε διάφορα περιβάλλοντα (Doughari HJ, et al., 2011). Βακτήρια του γένους *Acinetobacter* έχουν εντοπιστεί σε γαλακτοκομικά προϊόντα και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις, όπου η παρουσία συγκεκριμένων στελεχών έχει συσχετισθεί με την υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος. (Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt; Effects of Psychrotrophic Bacteria *Acinetobacter* genomospecies 10 and *Serratia liquefaciens* on Raw Milk Quality).

8. *Aeromonas*

Το *Aeromonas* είναι ένα γένος αρνητικό κατά gram, προαιρετικών αναερόβιων, ραβδωτών βακτηρίων που μορφολογικά μοιάζουν με μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Τα περισσότερα από τα 14 είδη που περιγράφονται έχουν συσχετιστεί με ανθρώπινες ασθένειες. Τα σημαντικότερα παθογόνα είναι τα *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*

και *Aeromonas veronii*biovarsobria. Οι οργανισμοί εντοπίζονται σε φρέσκο και υφάλμυρο νερό (Graf J, 2015). Δύο σημαντικές ασθένειες που σχετίζονται με το *Aeromonas* είναι η γαστρεντερίτιδα και λοιμώξεις από τραύματα, με ή χωρίς βακτηριαιμία. Η γαστρεντερίτιδα εμφανίζεται συνήθως μετά την κατάποση μολυσμένου νερού ή τροφής, ενώ οι μολύνσεις από τραύματα προκύπτουν από την έκθεση σε μολυσμένο νερό. Στελέχη του γένους *Aeromonas* έχουν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια και λαχανικά. (Martins LM, et al., 2002.)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τρόφιμα ζωτικής σημασίας και αναπτυξιακοί άξονες για τις χώρες που τα παράγουν και τα εμπορεύονται. Επιπλέον παρατηρείται στροφή των καταναλωτών προς την υγιεινή διατροφή και μάλιστα σε προϊόντα υψηλής ποιότητας, όσο γίνεται πιο φρέσκο και αγνό με ελάχιστη μεταποίηση, παραδοσιακά και βιολογικά. Διαθέτοντας πολλά από αυτά τα χαρακτηριστικά το γιαούρτι αποτελεί μία εύπεπτη, ελαφριά και θρεπτική τροφή για όλες τις ηλικίες. Είναι φυσικό αντιβιοτικό για μακροζωία και βελτιώνει την υγεία όταν καταναλώνεται τακτικά. Το γιαούρτι φτιάχνεται από φρέσκο αγελαδινό και πρόβειο γάλα στο οποίο αφού παστεριωθεί, προστίθενται καλλιέργειες που το πηζουν. Ζυμώνεται με τη δράση δύο βακτηρίων του *Lactobacillus delbrueckii* και του *Streptococcus thermophilus*. Μετά τη ζύμωση το γάλα μετατρέπεται σε γιαούρτι που έχει παχύρρευστη υφή και χαρακτηριστική υπόξινη γεύση. Απόρροια αυτής της διαδικασίας είναι ο εντοπισμός στο γιαούρτι μιας πληθώρας μικροοργανισμών που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ,τόσο για την ασφάλεια του προϊόντος, όσον αφορά στην κατανάλωσή του, όσο και στη διατήρηση και μακροζωία του προϊόντος καθώς και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας εξαρτάται από το ίδιο το ζώο ως ενδογενές φορτίο αλλά και από τις συνθήκες υγιεινής και καλής διαβίωσης που εφαρμόζονται στις εγκαταστάσεις . Είναι σημαντικό τα ζώα να βρίσκονται σε στάβλους που διαθέτουν ίδιες λειτουργίες και τηρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές που διασφαλίζουν την υγιεινή και την καλή διαβίωσή τους. Επίσης το μικροβιακό φορτίο του γάλακτος που αποτελεί την πρώτη ύλη για την παρασκευή του γιαουρτιού επηρεάζεται από τον τρόπο συλλογής του (άρμεγμα με χέρια, φορητές αρμεκτικές μηχανές και αρμεκτήρια σταθερών θέσεων) καθώς και τη μετασυλλεκτική μεταχείρισή του (παγολεκάνες, σωλήνες μεταφοράς). Επιπλέον η μεταφορά του από τις κτηνοτροφικές μονάδες προς τους σταθμούς συλλογής και τελικά στις βιομηχανίες θα πρέπει να γίνεται μόνο με κατάλληλα αυτοκίνητα-ψυγεία. Η μεταποίηση του γάλακτος για την παρασκευή γιαουρτιού στις βιομηχανίες και το δίκτυο διακίνησης και εμπορίας μέχρι τον τελικό καταναλωτή είναι δυνατόν να επηρεάσει τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του γιαουρτιού. Επομένως κρίνεται ιδιαίτερα

σημαντική η ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων ελέγχου της ποιότητας και της ποσότητας μικροβιακής κοινότητας του γιαουρτιού σε όλα τα στάδια από την παραγωγή της πρώτης ύλης μέχρι τον τελικό καταναλωτή και μάλιστα με αναλύσεις πέραν των παραδοσιακών μεθόδων που εφαρμόζονται. Οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα βασίζονται κυρίως στην ανίχνευση πρωτεϊνών όπως ηλεκτροφορητικές, χρωματογραφικές και ανοσολογικές (ELISA) . Ωστόσο τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές (SSCP, DGGE, TTGE) καθώς και ποσοτικές μέθοδοι όπως η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR). Η πλέον σύγχρονη τάση είναι η χρήση τεχνολογικών αλληλουχιών νέας γενιάς. Έτσι με τη χρήση παγκόσμιων εκκινητών (primers) που στοχεύουν σχεδόν στο σύνολο των μικροβιακών γονιδιωμάτων και πιο συγκεκριμένα στις υπερμεταβλητές περιοχές του 16S rRNA γονιδίου και την επακόλουθη αλληλούχηση σε βάθος (deep sequencing) έχουμε τη δυνατότητα να αναλύουμε ταυτόχρονα πολλά δείγματα που το καθένα αποτελείται από ένα σύνολο μικροοργανισμών.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν μοριακοί δείκτες για την ανίχνευση και ταυτοποίηση της μικροβιακής κοινότητας σε δείγματα γιαουρτιού. Συγκεκριμένα μετά την απομόνωση του DNA από τα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωμένου DNA και ακολούθησε PCR και αλληλούχηση του γονιδίου 16S r RNA. η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με Torrent Suite και Ion Reporter. Χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα γιαουρτιού. Ένα με πρώτη ύλη το αγελαδινό γάλα και δύο με πρώτη ύλη το πρόβειο γάλα. Με την εφαρμογή της μεθόδου η ταξινομητική ανάλυση έφτασε σε επίπεδο γένους και είδους.

Σε επίπεδο γένους ανιχνεύτηκαν 8 γένη βακτηρίων. Συγκεκριμένα στο δείγμα «yogurt cow» βρέθηκαν 8798 αλληλουχίες του γένους *Streptococcus* (66,9 % του συνόλου), 4302 αλληλουχίες του γένους *Lactobacillus* (32,4% του συνόλου), 114 αλληλουχίες του γένους *Flavobacterium* (0,85% του συνόλου), 48 αλληλουχίες του *Acinetobacter* (0,43% του συνόλου).

Στο δείγμα «yogurt probio 1» ανιχνεύτηκαν τα παρακάτω γένη : Το γένος *Lactobacillus* σε ποσοστό 63,7% , το γένος *Streptococcus* σε ποσοστό 33,4%, το γένος *Acinetobacter* σε ποσοστό 2,4% , το γένος *Aeromonas* σε

ποσοστό 0,05% το γένος *Enhydrobacter* σε ποσοστό 0,25% και το γένος *Lactococcus* σε ποσοστό 0,1%..

Στο δείγμα «yogurt probio 2» ανιχνεύτηκαν τα παρακάτω βακτήρια: το γένος *Streptococcus* σε ποσοστό 43,89%, το γένος *Lactobacillus* σε ποσοστό 45,1%, το γένος *Flavobacterium* σε ποσοστό 7,6 %και το γένος *Acinetobacter* σε ποσοστό 3,3 %.

Σε επίπεδο είδους ανιχνεύτηκαν 5 είδη βακτηρίων. Συγκεκριμένα στο δείγμα «yogurt cow» ανιχνεύτηκαν τα είδη *Lactobacillus delbrulckii* σε ποσοστό 32,4% και το είδος *Streptococcus thermophilus* σε ποσοστό 53,2%.

Στο δείγμα «yogurt probio 1» ανιχνεύτηκαν τα είδη είδη *Lactobacillus delbrulckii* σε ποσοστό 63,5%. Το είδος *Streptococcus Thermophilus* σε ποσοστό 30,5% , το είδος *Enhydrobacter* σε ποσοστό 0,25% και το είδος *Lactococcus* σε ποσοστό 0,1%.

Στο δείγμα «yogurt probio 2» ανιχνεύτηκαν τα είδη : *Lactobacillus delbrulckii* σε ποσοστό 45,1% , το είδος *Streptococcus Thermophilus* σε ποσοστό 36,7%.και το είδος *Streptococcus Uberis* σε ποσοστό 0,1%.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε, ανίχνευσε τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του γιαουρτιού. Επίσης ανιχνεύτηκαν ίχνη βακτηρίων τα οποία διαβιούν στο έδαφος και στο νερό , δεν αποτελούν την βασική μικροβιακή χλωρίδα του γιαουρτιού και δεν είναι επιθυμητά στο τελικό προϊόν (γιαούρτι). Επομένως η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο γιαούρτι και ενδεχομένως και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguirre M, Collins MD (August 1993). "Lactic acid bacteria and human clinical infection". J. Appl. Bacteriol. 75 (2): 95–107. PMID 8407678. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x.
- Åkerberg, C.; Hofvendahl, K.; Zacchi, G.; Hahn-Hägerdal, B. (1998). "Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour". Applied Microbiology and Biotechnology. 49 (6): 682–690. doi:10.1007/s002530051232.
- Alemayehu D, Hannon JA, McAuliffe O, Ross RP. 2014. Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. International journal of food microbiology 172:57-61.
- Ashraf, R., and N. P. Shah. 2011. Selective and differential enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt—A review. Int. J. Food Microbiol. 149:194–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008>.
- ATCC
- "Bacteria Genomes – *Streptococcus Thermophilus*". European Bioinformatics Institute. Archived from the original on 19 February 2013.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria) (D.R. Boone and R.W. Castenholz, eds.), Springer-Verlag, New York (2001). pp. 465-466.
- Bernardet; et al. (Jul 1994). "Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flaviobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatalis*

- Strohl and Tait 1978)". *Int J Syst Bacteriol.* 46 (3): 447–53. doi:10.1099/00207713-46-1-128.
- Biavati, B., M. Vescovo, S. Torriani, and V. Bottazzi. 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* 50:117–131.
 - Bitrian, Mariana; González, Rodrigo H.; Paris, Gaston; Hellingwerf, Klaas J.; Nudel, Clara B. (2013-09-01). "Blue-light-dependent inhibition of twitching motility in *Acinetobacter baylyi* ADP1: additive involvement of three BLUF-domain-containing proteins". *Microbiology.* 159 (Pt 9): 1828–1841. ISSN 1465-2080. PMID 23813679. doi:10.1099/mic.0.069153-0.
 - Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5214–5223.
 - Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryck S, Peppelenbosch MP, Steidler L (2006). "A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease.". *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4 (6): 754–759. PMID 16716759. doi:10.1016/j.cgh.2006.03.028.
 - Brett PJ, DeShazer D, Woods DE (January 1998). "*Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species". *International Journal of Systematic Bacteriology.* 48 Pt 1 (1): 317–20. PMID 9542103. doi:10.1099/00207713-48-1-317.
 - Clarridge JE (October 2004). "Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases". *Clinical Microbiology Reviews.* 17 (4): 840–62, table of contents. PMC 523561. PMID 15489351. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
 - Coenye T, Vandamme P (November 2003). "Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes". *FEMS Microbiology Letters.* 228 (1): 45–9. PMID 14612235. doi:10.1016/S0378-1097(03)00717-1.

- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., 2008. Dairy products. In: Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, New York, pp. 31–90.
- Courtin, P.; Rul, F. O. (2003). "Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model". *Le Lait*. 84: 125–134. doi:10.1051/lait:2003031.
- De Filippis, F., La Storia, A., Stellato, G., Gatti, M., Ercolini, D., 2014a. A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLoS One* 9, e89680. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089680>.
- Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube, G., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, herve cheese, using metagenomic analysis. *J. Dairy Sci.* 97, 6046–6056.
- Delcour, J.; Ferain, T.; Hols, P. (2000). "Advances in the Genetics of Thermophilic Lactic Acid Bacteria". *Food Biotechnology*. 11: 497–504. doi:10.1016/s0958-1669(00)00134-8.
- De Pasquale, I., Calasso, M., Mancini, L., Ercolini, D., La Storia, A., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2014a. Causal relationship between microbial ecology dynamics and proteolysis during manufacture and ripening of canestrato pugliese PDO cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4085–4094.
- De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2014b. Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata caciocavallo pugliese cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6243–6255. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02097-14>.
- Dobson; Colwell, RR; McMeekin, TA; Franzmann, PD; et al. (Jan 1993). "Direct sequencing of the polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene of *Flavobacterium gondwanense* sp. nov. and *Flavobacterium salegens* sp nov., two new species from a hypersaline antarctic lake". *Int J Syst Bacteriol.* 43 (1): 77–83. PMID 7678983. doi:10.1099/00207713-43-1-77.

- Dolci, P., De Filippis, F., La Stora, A., Ercolini, D., Cocolin, L., 2014. RRNA-based monitoring of the microbiota involved in fontina PDO cheese production in relation to different stages of cow lactation. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 127–135.
- Doughari HJ; Ndakidemi PA; Human IS; Benade S (2011). "The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.:an overview". *Microbes and Environments.* 26 (2): 101–112. PMID 21502736. doi:10.1264/jsme2.me10179
- Doyle CJ, Gleeson D, Jordan K, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2015. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International journal of food microbiology* 197:77-87.
- Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A., Iacono, M., 2012. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8142–8145. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02218-12>.
- F., Felis, Giovanna E., Castioni, A., Torriani, S., and Germond, J. "Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus subsp. nov., isolated from Indian dairy products". 2005. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* Volume 55. p. 401-404.
- Facklam RR, Pigott NE, Collins MD. Identification of *Lactococcus* species from human sources. *Proceedings of the XI Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases*, Siena, Italy. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1990:127
- FDA. "History of the GRAS List and SCOGS Reviews". FDA. Retrieved 11 May 2012.
- Graber, H.U., Casey, M.G., Naskova, J., Steiner, A., Schaeren, W., 2007. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science* 90, 4661–4669.
- Graf J (editor). (2015). *Aeromonas*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-908230-56-0.
- Gray JP, Herwig RP (November 1996). "Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments". *Applied and*

Environmental Microbiology. 62 (11): 4049–59. PMC 168226 . PMID 8899989.

- Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ (1984). "On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA". Nucleic Acids Research. 12 (14): 5837–52. PMC 320035 . PMID 6462918. doi:10.1093/nar/12.14.5837.
- Hantsis-Zacharov E, Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. Applied and environmental microbiology.73:7162-7168.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecology 35, 1–21.
- Heymann DL. Control of Communicable Diseases Manual. Washington DC: American Public Health Association; 2008, 357-361.
- <http://milkfacts.info/yogurt/production>
- <http://web2.uwindsor.ca/courses/biology/fackrell/Microbes/5640.htm>
- <http://www.bacterio.net/flavobacterium.html>
- <https://www.healthyeating.org/Milk-Dairy/Nutrients-in-Milk-Cheese-Yogurt/Yogurt-Nutrition>
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. Journal of Bacteriology 180, 4765–4774.
- "Influence_of_temperature_on_associative_growth_of_Streptococcus_thermophilus_and_Lactobacillus_bulgaricus."
- Integr8 - Species search results:
- J., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G., and Dellaglio, F. "Evolution of the Bacterial Species Lactobacillus delbrueckii: A Partial Genomic Study with Reflections on Prokaryotic Species Concept". Molecular Biology and Evolution. 2003. Volume 20. p. 93-104.
- John G Holt (1 October 1993). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9 ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0683006037.
- Kable ME, Srisengfa Y, Laird M, Zaragoza J, McLeod J, Heidenreich J, Marco ML. 2016. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk

in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *mBio* 7(4):e00836-16. doi:10.1128/mBio.00836-16.

- Kiliç, AO; Pavlova, SI; Ma, WG; Tao, L (1996). "Analysis of Lactobacillus phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt". *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (6): 2111–6. PMC 167989 Freely accessible. PMID 8787408.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103–125. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X).
- Kok, J., Buist, G., Zomer, A. L., van Hijum, S. a F. T., & Kuipers, O. P. (2005). "Comparative and functional genomics of lactococci.". *FEMS Microbiology Reviews*. 29 (3): 411–33. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.004.
- Kolbert CP, Persing DH (June 1999). "Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens". *Current Opinion in Microbiology*. 2 (3): 299–305. PMID 10383862. doi:10.1016/S1369-5274(99)80052-6.
- LPSN bacterio.net
- Lu T, Stroot PG, Oerther DB (July 2009). "Reverse transcription of 16S rRNA to monitor ribosome-synthesizing bacterial populations in the environment". *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (13): 4589–98. PMC 2704851 . PMID 19395563. doi:10.1128/AEM.02970-08.
- Madigan M, Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.
- Mannion PT, Rothburn MM (November 1990). "Diagnosis of bacterial endocarditis caused by *Streptococcus lactis* and assisted by immunoblotting of serum antibodies". *J. Infect.* 21 (3): 317–8. PMID 2125626. doi:10.1016/0163-4453(90)94149-T.
- Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD (July 1992). "Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations". *Int. J. Syst.*

- Bacteriol. 42 (3): 412–21. PMID 1380289. doi:10.1099/00207713-42-3-412.
- Martins LM, Marquez RF, Yano T. 2002. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32:237–242. 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00559.x
 - McMurdie and Holmes (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE. 8(4):e61217
 - Minnaganti, Venkat R.; Patel, Pankaj J.; Iancu, Dan; Schoch, Paul E.; Cunha, Burke A. (2000). "Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*". Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care. 29 (4): 306–308. ISSN 0147-9563. PMID 10900069. doi:10.1067/mhl.2000.106723.
 - Mudarris; Austin, B.; Segers, P.; Vancanneyt, M.; Hoste, B.; Bernardet, J. F.; et al. (Jan 1993). "Flavobacterium scophthalmum sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)". Int J Syst Bacteriol. 44 (1): 77–83. PMID 8068540. doi:10.1099/00207713-44-3-447.
 - Ondov BD, Bergman NH, and Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC Bioinformatics. 2011 Sep 30; 12(1):385.
 - Partanen, L., Marttinen, N., Alatossava, T. "Fats and Fatty Acids as Growth Factors for *Lactobacillus delbrueckii*". 2001. Volume 24. p.500-506.
 - Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, van Asch B, Pinto N, Gusmão L, Amorim A (December 2010). "Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences". Nucleic Acids Research. 38 (22): e203. PMC 3001097. PMID 20923781. doi:10.1093/nar/gkq865.
 - Pyrosequencing Analysis of the Microbial Diversity of Airag, Khoormog and Tarag, Traditional Fermented Dairy Products of Mongolia.
 - Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. Int. J. Food Microbiol. 150, 81–94.

- Rijkers GT, de Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P; De Vos; Brummer; Morelli; Corthier; Marteau (2011). "Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing". *British Journal of Nutrition*. 106 (9): 1291–6. PMID 21861940. doi:10.1017/S000711451100287X.
- Riquelme, C., Câmara, S., de Lurdes, N., Enes Dapkevicius, M., Vinuesa, P., da Silva, C.C.G., Malcata, F.X., Rego, O.A., 2015. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int. J. Food Microbiol.* 192, 86–94.
- ROISSART, H. and Luquet F.M. *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. Uriage, Lorica, France, 1994, vol. 1, p. 605. ISBN 2-9507477-0-1
- Samuel Baron. *Medical Microbiology*. 4th ed. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- Schmidt TM, Relman DA (1994). "Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences". *Methods in Enzymology*. 235: 205–22. ISBN 978-0-12-182136-4. PMID 7520119. doi:10.1016/0076-6879(94)35142-2.
- Schornsteiner, E., Mann, E., Bereuter, O., Wagner, M., Schmitz-Esser, S., 2014. Cultivation independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *Int. J. Food Microbiol.* 180, 88–97.
- Sieuwerts, S.; Molenaar, D.; Van Hijum, S. A. F. T.; Beerthuyzen, M.; Stevens, M. J. A.; Janssen, P. W. M.; Ingham, C. J.; De Bok, F. A. M.; De Vos, W. M.; Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2010). "Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*". *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (23): 7775–7784. PMC 2988612 Freely accessible. PMID 20889781. doi:10.1128/AEM.01122-10.
- Staley, J. T.; Irgens, R. L.; Brenner, D. J. (1987). "Enhydrobacter aerosaccus gen. nov., sp. nov., a Gas-Vacuolated, Facultatively Anaerobic, Heterotrophic Rod". *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37 (3): 289. doi:10.1099/00207713-37-3-289.

- "Streptococcus Thermophilus: A Bacterium Which Is Harmless to Health." International Research Associates. 14 Nov. 2006. Web. 25 Apr. 2011.
- Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt; Effects of Psychrotrophic Bacteria *Acinetobacter* genomospecies 10 and *Serratia liquefaciens* on Raw Milk Quality
- Tannock, Gerald W., ed. (2005). Probiotics And Prebiotics: Scientific Aspects. Caister Academic Press. p. 43. ISBN 1-904455-01-8. Retrieved 2014-03-31.
- Taxonomy Browser
- ThermoFisher SCIENTIFIC, Ion Torrent. 16S rRNA Sequencing An integrated research solution for bacterial identification using 16S rRNA sequencing on the Ion PGM™ System with Ion Reporter™ Software
- "Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB: List No. 54". International Journal of Systematic Bacteriology. 45 (3): 619–620. July 1995. doi:10.1099/00207713-45-3-619.
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R (1996). "A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA". Nucleic Acids Research. 24 (17): 3381–91. PMC 146102. PMID 8811093. doi:10.1093/nar/24.17.3381.
- van Hylckama Vlieg, Johan E T, Rademaker, J. L. W., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W. J., & Siezen, R. J. (2006). "Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*". Current Opinion in Biotechnology. 17 (2): 183–90. doi:10.1016/j.copbio.2006.02.007. 14
- Větrovský T, Baldrian P (2013-02-27). "The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses". PloS One. 8 (2): e57923. Bibcode:2013PLoSO...857923V. PMC 3583900. PMID 23460914. doi:10.1371/journal.pone.0057923.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (January 1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". Journal of Bacteriology. 173 (2): 697–703. PMC 207061. PMID 1987160.

- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S.; et al. (November 2004). "The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation.". *Trends in Food Science & Technology*. 15 (10): 498–505. doi:10.1016/j.tifs.2004.03.003.
- Woese CR, Fox GE (November 1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74 (11): 5088–90. Bibcode:1977PNAS...74.5088W. PMC 432104 . PMID 270744. doi:10.1073/pnas.74.11.5088.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (June 1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87 (12): 4576–9. Bibcode:1990PNAS...87.4576W. PMC 54159 . PMID 2112744. doi:10.1073/pnas.87.12.4576.
- Vacheyrou M, Normand A-C, Guyot P, Cassagne C, Piarroux R, Bouton Y. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International journal of food microbiology* 146:253-262.
- Yang B, Wang Y, Qian PY (March 2016). "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis". *BMC Bioinformatics*. 17 (1): 135. PMC 4802574 . PMID 27000765. doi:10.1186/s12859-016-0992-y.
- Zacarchenco, P. B., and S. Massaguer-Roig. 2006. Properties of *Streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentrations of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Braz. J. Microbiol.* 37:338–344. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000300025>.